

Aus dem Institut für Pathologie des  
GSF - Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit  
Vorstand: Prof. Dr. H. Höfler  
Angefertigt unter Leitung von PD Dr. M. Atkinson und PD Dr. L. Quintanilla-Fend

Vorgelegt über den  
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie  
am Institut für Tierpathologie  
der Tierärztlichen Fakultät Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. W. Schmahl

# Histologische und molekulargenetische Untersuchungen von strahleninduzierten Schilddrüsentumoren im Mausmodell

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Gabriele Cornelia Hölzlwimmer  
aus München

München 2007

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer

Referent: Univ.-Prof. Dr. W. Schmahl

Koreferenten: Priv. Doz. Dr. Reese

Jun. Prof. Dr. Deeg

Univ.-Prof. Dr. Köstlin

Prof. Dr. Kaltner

Tag der Promotion:

20. Juli 2007

***Meiner Familie***

## **INHALTSVERZEICHNIS:**

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>SCHRIFTTUM</b>	<b>2</b>
1.	Die Schilddrüse (Glandula thyreoidea)	2
1.1.	Anatomie und Histologie der Schilddrüse bei der Maus	2
1.2.	Embryologie der Schilddrüse bei der Maus	2
1.3.	Physiologie der Schilddrüse: Schilddrüsenhormone	3
1.4.	Pathophysiologie: Funktionsstörungen der Schilddrüse	3
1.5.	Epidemiologie und Ätiologie der Schilddrüsentumoren	4
1.5.1.	Humane Schilddrüsentumoren	4
1.5.2.	Schilddrüsentumoren in der Veterinärmedizin	6
1.5.3.	Murine Schilddrüsentumoren	6
1.5.3.1.	Spontane Schilddrüsentumoren bei der Maus	6
1.5.3.2.	(Strahlen-) induzierte Schilddrüsentumoren bei der Maus	7
2.	Pathologische Histologie der Schilddrüse bei Mensch und Maus	8
2.1.	Vergleichende Betrachtung humaner und muriner Klassifizierungsschemata der Schilddrüsentumordiagnostik	8
2.2.	Altersassoziierte Veränderungen der Schilddrüse bei der Maus	10
2.3.	Schilddrüsenhyperplasie (Kropf, Struma, <i>Goiter</i> )	11
2.4.	Follikuläres Schilddrüsenadenom (FA)	13
2.5.	Gut differenzierte Schilddrüsenkarzinome	16
2.5.1.	Humanes follikuläres Schilddrüsenkarzinom (FK)	16
2.5.2.	Humanes papilläres Schilddrüsenkarzinom (PK)	17
2.5.3.	Murines (follikuläres) Schilddrüsenkarzinom	19
2.5.4.	„Murines papilläres Schilddrüsenkarzinom (murines PK)“	21
2.5.5.	Zusammenfassung: Gut differenzierte Tumoren bei Mensch und Maus	21
2.6.	Undifferenzierte (anaplastische) Schilddrüsenkarzinome bei Mensch und Maus	22

3.	Genetik: Molekulare Eigenschaften der Schilddrüsentumoren	23
3.1.	Allgemeine molekulare Mechanismen der Karzinogenese	23
3.1.1.	Genmutationen - „Genmutationshypothese“	23
3.1.2.	Einteilung der an der Karzinogenese beteiligten Gene (Tumorgene)	24
3.1.2.1.	Onkogene	24
3.1.2.2.	Tumorsuppressorgene - „2-Treffer-Modell“ nach Knudson	25
3.1.2.3.	Stabilitätsgene ( <i>Caretaker</i> ) - Genetische Instabilität	26
3.1.2.4.	Tumorsuszeptibilitätsgene	27
3.1.3.	Aneuploidie - „Aneuploidiehypothese nach Boveri“	27
3.1.4.	Strahleninduzierte Karzinogenese	28
3.2.	Schilddrüsenkarzinogenese beim Menschen anhand molekulargenetischer Eigenschaften	28
3.2.1.	Molekulargenetische (ätiologische) Profile humaner Schilddrüsentumoren	28
3.2.1.1.	Noduläre Hyperplasie (NH) und follikuläres Adenom (FA)	28
3.2.1.2.	Follikuläres Schilddrüsenadenom und -karzinom (FA und FK)	29
3.2.1.3.	Papilläres Schilddrüsenkarzinom (PK)	29
3.2.1.4.	Anaplastische Karzinome	31
3.2.2.	Allelische und chromosomale Imbalancen bei humanen Schilddrüsentumoren	31
3.2.2.1.	Mikrosatelliten-Imbalancen	31
3.2.2.2.	Chromosomale Imbalancen	32
3.2.3.	Immunhistochemische (diagnostische) Profile humaner Schilddrüsentumoren	33
3.3.	Transgene Mausmodelle für Schilddrüsenkarzinogenese	35
<b>III.</b>	<b>MATERIAL und METHODEN</b>	<b>37</b>
1.	Untersuchungsmaterial (Tierexperiment)	37
2.	Histologie	38
2.1.	Anfertigung der histologischen Schnittpräparate	38
2.2.	Histologische Klassifizierung der Schilddrüsenpräparate	38
2.3.	Immunhistochemie (IHC)	39

3.	Probengewinnung für die LOH- ( <i>Loss of Heterozygosity</i> -) und Array-CGH- (komparative genomische Hybridisierungs-) Studien	41
3.1.	Laser-assistierte Mikrodissektion (LAM)	41
3.1.1.	Aufbau des Gerätes	41
3.1.2.	Arbeitsablauf	41
3.2.	DNA-Extraktion	43
3.2.1.	Proteinase K-Behandlung des mikrodisezierten Materials für die LOH-Studie	43
3.2.2.	DNA-Extraktion aus dem mikrodisezierten Material für die Array-CGH-Studie	43
3.2.3.	DNA-Extraktion aus Schwanzspitzengewebe	43
4.	Multilocus LOH-Analyse durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	44
4.1.	Mikrosatelliten-Marker	44
4.2.	Polymerase-Kettenreaktion	45
4.3.	Agarose-Gelelektrophorese	45
5.	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) für den <i>Rb1</i> -Lokus	46
5.1.	Vorbereitung und Färbung der Rb1-FISH-Sonde	46
5.2.	Vorbereitung der Gewebeprobe	46
5.3.	Hybridisierung und Waschschrirte nach der Hybridisierung	47
5.5.	Auswertung der FISH-Analyse	47
6.	BAC Array-CGH-Untersuchung	48
6.1.	Herstellung der BAC-Microarrays	49
6.2.	Vorbereitung der Proben für die Array-CGH	49
6.2.1.	Qualitätsüberprüfung der durch Mikrodissektion gewonnenen Proben- und Referenz-DNA (Schilddrüse und umgebendes Gewebe)	49
6.2.2.	Aufreinigung der aus Schwanzspitzengewebe gewonnenen Referenz-DNA	50
6.3.	Markieren der genomischen Proben- und Referenz-DNA mittels <i>Random Primer Labeling</i>	50
6.4.	Hybridisierung	51
6.4.1.	Vorbereitung der Microarrays: Spülen, Blocken und Prähybridisierung	51
6.4.2.	Hybridisierung der Proben auf die Microarray-Objektträger	51

6.4.3.	Waschschritte nach der Hybridisierung	51
6.5.	Array-CGH-Datenanalyse	52
6.5.1.	Aufbereitung der Array-CGH-Daten und Normalisierung	52
6.5.2.	Auswertung der Array-CGH-Daten	53
7.	Statistische Auswertung	54
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>55</b>
1.	Ergebnisse der histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen	55
1.1.	Die histologische Klassifizierung der Schilddrüsenläsionen	55
1.1.1.	Gesunde Schilddrüse der Maus und altersbedingte Veränderungen	55
1.1.2.	Simple Hyperplasie (SH)	56
1.1.3.	Komplexe (noduläre) Hyperplasie (NH)	58
1.1.4.	Follikuläres Schilddrüsenadenom (FA)	60
1.1.5.	Follikuläres Schilddrüsenkarzinom (FK)	62
1.1.6.	Papilläres Schilddrüsenkarzinom (PK)	66
1.2.	Statistische Auswertung der histologischen Befunde	67
1.2.1.	Korrelation der Befunde mit dem genetischen Hintergrund	68
1.2.1.1.	Befunde der H6F1-Hybridmäuse	71
1.2.1.2.	Befunde der BHF1-Hybridmäuse	71
1.2.1.3.	Befunde der J6F1-Hybridmäuse	72
1.2.1.4.	Befunde der JHF1-Hybridmäuse	72
1.2.1.5.	Befunde der J6F2-Hybridmäuse	73
1.2.1.6.	Befunde der JHF2-Hybridmäuse	73
1.2.2.	Assoziation der Befunde mit dem genetischen Hintergrund der beteiligten Mausinzuchtstämme	74
1.2.3.	Assoziation der Tumorinzidenz mit dem Geschlecht der Mäuse	74
1.2.4.	Assoziation der Befunde mit dem Alter der Mäuse	75
1.3.	Ergebnisse der Immunhistochemie (IHC)	76

2.	Ergebnisse der LOH- ( <i>loss of heterozygosity</i> -) Studie	77
2.1.	LOH-Profil bei den H6F1-Mäusen	78
2.2.	LOH-Profil bei den BHF1- und J6F1-Mäusen	82
3.	Ergebnisse der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	82
4.	Ergebnisse der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH)	84
4.1.	Vergleich der Hybridisierung mit aus Formalin-fixiertem und aus unfixiertem (Schwanzspitzen) Gewebe isolierter Referenz-DNA	84
4.2.	Festlegung der Analysekriterien für „kleine“ Alterationen	85
4.3.	Vorliegen von Veränderungen auf chromosomaler Ebene	88
4.4.	Detektierte Alterationen in den CGH-Profilen	89
4.5.	Vergleich der Array-Profile aller Proben	92
4.5.1.	Deletionen und Monosomien	92
4.5.2.	Amplifizierungen und Polyploidien (Trisomien)	93
4.6.	CGH-Profile der FK in Zusammenhang mit verschiedenen Parametern	93
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>95</b>
1.	Histologie	96
1.1.	Histologische Klassifizierung der murinen Schilddrüsentumoren	97
1.2.	Tumorinzidenz und Tumorentstehung	101
1.3.	Fazit aus der histologischen Untersuchung	107
2.	Genetik	108
2.1.	LOH- und FISH-Analyse: Mikrosatelliten-Imbalancen	108
2.2.	CGH-Analyse	111
2.2.1.	Etablierung der Array-CGH aus FFPE-Gewebe bei der Maus	111
2.2.2.	Chromosomale Imbalancen	113
2.3.	Fazit aus der GCH- und der LOH-Studie	117
3.	Ausblick	119



<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>120</b>
	<b>SUMMARY</b>	<b>122</b>
<b>VII.</b>	<b>LITARATURVERZEICHNIS</b>	<b>124</b>
<b>VIII.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>140</b>
1.	Materialien	140
1.1.	Herstellungsrezepte für die verwendeten Lösungen	140
1.2.	Sonstige Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	141
2.	Tabellenanhang	142
<b>DANKSAGUNG</b>		

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AI	allelische Imbalance
B6F1	F1-Hybridkreuzung aus den Mauslinien BALB/c und C57/BL6
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
BALB/c	Maus-Inzuchtstamm
bidest.	doppelt destilliert
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
C3H	Maus-Inzuchtstamm C3H
C57/BL6	Maus-Inzuchtstamm C57/Black 6
cCGH	chromosomale CGH (im Gegensatz zur Array-CGH)
CGH	<i>comparative Genomic Hybridization</i> (komparative genomische Hybridisierung)
Chr.	Chromosom
Ck 19	Cytokeratin 19
CNIO	Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas
Cy3	Fluorophor Carbocyanin 3
Cy5	Fluorophor Carbocyanin 5
DAB	Diaminbenzidin
Def.	Definition
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMAD	<i>Diagnosis and Normalization for MicroArray Data</i>
DOP	<i>Degenerate Oligonucleotid Primer</i>
dUTP	Desoxy-Uridin-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
etc	et cetera
evtl.	eventuell
F1	Filialgeneration 1
F2	Filialgeneration 2
FFPE	Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
FA	follikuläres Schilddrüsenadenom
FA-PV	follikuläres Schilddrüsenadenom - papilläre Variante
FK	follikuläres Schilddrüsenkarzinom
FT	follikulärer Tumor (FA + FC)
FT-UMP	<i>follicular tumor of uncertain malignant potential</i>
Gal-3	Galectin-3
HE	Hämatoxilin-Eosin
HWZ	Halbwertszeit
i. A.	im Allgemeinen
i. d. R.	in der Regel
I <sup>131</sup>	Radiojod-Isotop mit der Nukleonenzahl 131
I131-Maus	Radiojod-behandelte Maus
Ig	Immunglobulin
J6F1	F1-Hybridkreuzung aus den Mauslinien JF1 und C57/BL6
J6F2	F2-Hybridkreuzung aus den Mauslinien JF1 und C57/BL6
JF1	Maus-Inzuchtstamm Japanese Fancy 1
JHF1	F1-Hybridkreuzung aus den Mauslinien JF1 und C3H
JHF2	F2-Hybridkreuzung aus den Mauslinien JF1 und C3H
LAM	Laser-assistierte Mikrodisektion
LMM	<i>Laser-Microbeam-Microdissection</i>

LMPC	zusammengesetzte Methode aus LMM und LPC
log <sub>2</sub>	binärer Logarithmus
LOH	<i>Loss of Heterozygosity</i>
LPC	<i>Laser-Pressure-Catapulting</i>
m	männlich
MEN	<i>multiple endocrine neoplasias</i>
MSI	Mikrosatelliten-Instabilität
MW	Mittelwert
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NP40	Nonidet P40
NH	noduläre Hyperplasie
n. s.	nicht signifikant
NTP	<i>National toxicology program</i>
opB	ohne pathologischen Befund
PAR	populationsattributables Risiko
PBS	<i>Phosphate buffered Saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PK	papilläres Schilddrüsenkarzinom
PK-FV	papilläres Schilddrüsenkarzinom - follikuläre Variante
PK-SV	papilläres Schilddrüsenkarzinom - solide Variante
pRb1	Rb1-Protein
PTC	<i>papillary thyroid carcinoma</i> (papilläres Karzinom)
Rb1	Retinoblastoma 1
RR	relatives Risiko
RRD	relative Risikodifferenz
rtu	ready to use
σ	Standardabweichung sigma
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
SA-HRP	Streptavidin Horseradish Peroxydase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SH	simple Hyperplasie
sog.	sogenannte(r)
SSC	<i>Sodium Chloride-Sodium Citrate</i>
SW	Schwellenwert
T3	Trijodthyronin
T4	Tetrajodthyronin, Thyroxin
Tab.	Tabelle
Taq	Bakterium <i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>Tris buffered Saline</i>
ThG	Thyr(e)oglobulin
TRH	<i>Thyrotropin-releasing hormone</i> (Thyreoliberin)
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
TSG	Tumorsuppressorgen
TSH	<i>Thyroid stimulating hormone</i> (Thyreotropin)
TT	<i>Tail Tip</i> (Schwanzspitze)
u. a.	unter anderem
UBB	Ultimobranchialkörper
UV	Ultraviolett
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche

w	weiblich
WDC-NOS	<i>well-differentiated carcinoma - not otherwise specified</i>
WDT-UMP	<i>well-differentiated tumor of uncertain malignant potential</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

Abkürzungen Einheiten:

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
bp	Basenpaar
d	Tage
g	Schleuderziffer (Beschleunigungskräfte)
Gy	Energiedosis in Gray [J/kg]
kb	Kilobasen
kBq	Radioaktivität in Kilobecquerel [1/sec]
l	Liter
M	Molar
Mb	Megabasen
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
ng	Nanogramm
Rad	Energiedosis in Rad (veraltet) (1 Rad = 0,01 Gy)
rpm	<i>Revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
Sv	Äquivalentdosis in Sievert [J/kg]
U	<i>Unit</i>

## **I. EINLEITUNG**

Obwohl nur 1 % aller humanen Tumoren die Schilddrüse betreffen und meist von benigner Natur sind, stellen Schilddrüsenkarzinome dennoch weltweit den größten und weiterhin zunehmenden Anteil maligner endokriner Tumoren dar (ca. 122 000 Fälle / Jahr). Die besonders bei Kindern signifikant erhöhte Schilddrüsentumorinzidenz im Zuge des Reaktorunglückes von Tschernobyl 1986 ist in erster Linie auf die Freisetzung großer Mengen der Radiojodisotope  $I^{131}$  und  $I^{132}$  zurückzuführen, welche nach Anreicherung in der Schilddrüse ihre genotoxische Wirkung über Aussendung von Beta- und Gammastrahlung bei ihrem radioaktiven Zerfall entfalten.

Im Zuge zahlreicher molekulargenetischer Studien mit reseziertem Gewebe, unter anderem mit strahlen- (Tschernobyl-) assoziierten Veränderungen, konnten mehrere Kandidatengene für die Schilddrüsenkarzinogenese beim Menschen ermittelt werden. Von übergeordneter Bedeutung ist hierbei die aktivierende Rearrangierung des sog. *ret*/PTC-Onkogens. Epidemiologische und molekulare Daten belegen jedoch die Beteiligung einer Vielzahl weiterer Gene und derer Signalkaskaden an genetischer Suszeptibilität, Tumor-Initiation, Transformation und Progression, wobei besonders die kombinatorische Wirkung mehrerer Gene weiterführenden Untersuchungen schwer zugänglich ist.

Die Etablierung von Mausmodellen für humane Schilddrüsenkarzinogenese ermöglicht die detaillierte Untersuchung zugrunde liegender molekularer und biochemischer Stoffwechselwege, da hierbei das Ausmaß beeinflussender äußerer und innerer Faktoren und die genetische Heterogenität der Untersuchungsgruppe minimiert werden. Für die vorliegende Studie erfolgte eine gezielte Induktion von Schilddrüsentumoren bei den un- / neugeborenen Mäusen mittels Radionuklid  $I^{131}$ -Injektion in die Muttertiere.

Ziel der Arbeit war eine umfassende histomorphologische und molekulargenetische Analyse dieses Mausmodells für strahleninduzierte Schilddrüsenkarzinogenese. Die Etablierung einer reproduzierbaren histologischen Klassifizierung der murinen Schilddrüsentumoren diene als Grundlage für weiterführende Untersuchungen und wurde im Sinne der Vergleichbarkeit in Anlehnung an die humanpathologischen Kriterien durchgeführt. Im Rahmen der genetischen Untersuchungen des Tumorgewebes fanden die komparative genomische Hybridisierung (Array-CGH) zur genomweiten Detektion chromosomaler Imbalancen und die LOH- (*loss of heterozygosity*-) Studie zum Auffinden von Mikrosatelliten-Imbalancen Anwendung. Ergänzend wurden Immunhistochemie und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) durchgeführt.

## **II. SCHRIFTTUM**

### **1. Die Schilddrüse (Glandula thyreoidea)**

#### **1.1. Anatomie und Histologie der Schilddrüse bei der Maus**

Die Schilddrüse besteht aus zwei seitlich der Trachea liegenden Seitenlappen (Lobi), welche über eine dünne Parenchymbrücke (Isthmus) ventral der Trachea miteinander verbunden sind. Sie ist umgeben von einer dünnen fibrösen Kapsel, die zudem die Parathormon- (PTH-) produzierenden Nebenschilddrüsen (Epithelkörperchen, Glandulae parathyreoideae) umfasst, welche der Schilddrüse beidseits meist dorsolateral anliegen (Boorman und Hardisty, 1999).

Die Schilddrüse enthält zwei verschiedene Typen endokriner Zellpopulationen: Die in Follikeln angeordneten Thyreozyten und die parafollikulären C-Zellen. Erstgenannte kleiden als einschichtiges Epithel die unterschiedlich großen, sphärischen Schilddrüsenfollikel aus, in deren Lumen sich die als eosinophiles Kolloid (Gérard *et al.*, 2004) gespeicherten Schilddrüsenhormonpräkursoren befinden. Die Follikelgröße, die Höhe des flachen bis hochprismatischen Follikelepithels sowie die Menge und Färbequalität des Kolloids reflektieren die sekretorische Aktivität der Schilddrüse. Insgesamt zeigt sich die morphologische Variabilität in Abhängigkeit von Fütterung, Umgebung, Geschlecht, Alter, endokrinem Status und anderen Faktoren (Boorman und Hardisty, 1999).

Die Follikelepithelzellen besitzen basale runde Zellkerne, leicht basophiles Zytoplasma, und an ihrer lumenseitigen Oberfläche kurze Mikrovilli.

#### **1.2 Embryologie der Schilddrüse bei der Maus**

Die Schilddrüse ist das erste endokrine Organ, das sich beim Mäuse-Embryo entwickelt (Theiler *et al.*, 1972). Während des achten Gestationstages formiert sie sich als eine mediale epitheliale Masse ventral des primitiven Pharynx zwischen der ersten und zweiten Schlundtasche. Infolge der Involution des die Schilddrüse mit der Schlundtasche verbindenden „ductus thyreoglossus“ kommt es zur Ablösung der Schilddrüse vom pharyngealen Endoderm. Diese Primordial-Schilddrüse fusioniert mit den aus der Neuralleiste stammenden Ultimobranchialkörpern (UBB, Vorläufer der C-Zellen). Die Formierung des follikulären Musters beginnt ab dem 17. Tag und ab Tag 19 setzt die sekretorische Aktivität der Schilddrüsenfollikel ein (Boorman und Hardisty, 1999).

### **1.3 Physiologie der Schilddrüse: Schilddrüsenhormone**

Die parafollikulären C-Zellen produzieren das Mineralstoffwechselhormon Calcitonin. Dieses wird in Abhängigkeit vom Kalziumgehalt des Blutes gebildet, unmittelbar an selbiges abgegeben, und bewirkt eine Senkung des Blutkalziumspiegels (Silbernagl, 1991).

Die Thyreozyten bilden die Schilddrüsenhormone Trijodthyronin (T3) und Thyroxin (Tetrajodthyronin, T4, Prohormon), wobei es sich um jodierte Tyrosin-Derivate handelt, welche in mehreren Schritten synthetisiert werden: Das aus der Nahrung stammende Jodid wird über basalseitige „Jodpumpen“ (Jodid-ATPasen) aktiv in die Follikel epithelzellen aufgenommen (Jodination) und durch Peroxidasen zu Jod ( $I_2$ ) oxidiert. Mittels Jodtransferasen erfolgt apikal intrazellulär und im Lumen die Jodierung der Tyrosinreste des in den Follikelzellen synthetisierten Glykoproteins Thyro(globulin (ThG), zu Mono- und Dijodtyrosin. Durch Kopplung zweier Jodtyrosine (Jodisation) entstehen ThG-gebundenes T3 bzw. T4. Die als Kolloid im Follikellumen gespeicherten, inaktiven Schilddrüsenhormone werden bei Bedarf über Endozytose in die Thyreozyten wieder aufgenommen und nach Abspaltung vom ThG in die Blutkapillaren sezerniert (Löffler, 1999).

Die Funktion der Schilddrüsenfollikelzellen wird durch das hypothalamisch-hypophysäre System reguliert. Das im Hypothalamus gebildete TRH (*Thyrotropin-releasing hormone*) stimuliert die TSH- (*Thyroid stimulating hormone*-) Sekretion der Adenohypophyse. TSH fördert als glandotropes Hormon die Synthese und Sekretion der Schilddrüsenhormone sowie das Schilddrüsenwachstum. Über negative Rückkopplung hemmen T3 und T4 im Blut die TRH- und TSH-Freisetzung (Slebozinski, 1994).

Die Schilddrüsenhormone spielen eine essentielle Rolle bei Wachstums- und Reifungsprozessen (v. a. Förderung der Gehirnentwicklung und des Knochenwachstums), und zeichnen sich durch eine allgemein stimulierende Wirkung auf den zellulären Stoffwechsel aus (Silbernagl, 1991; Löffler, 1999).

### **1.4 Pathophysiologie: Funktionsstörungen der Schilddrüse**

Beim Kropf (Struma) handelt es sich definitionsgemäß um eine klinisch erkennbare Vergrößerung der Schilddrüse. Entsprechend der Schilddrüsenhormonproduktion definiert man hyper-, hypo- und euthyreote Struma, die ätiologisch in folgende Formen unterteilt werden (Rosai, 2004): Ein **dyshormonogenetischer Kropf** ist auf genetisch determinierte Störungen (Enzymdefekte) des Schilddrüsenhormonstoffwechsels zurückzuführen und

## II. SCHRIFTTUM

manifestiert sich i. d. R. als multinoduläre Hyperplasie. Bei den **endemischen Struma** in den sog. Jodmangelgebieten (mit definitionsgemäßer Jodmangelkropfhäufigkeit von mindestens 10 %) liegt zunächst infolge der erhöhten TSH-Stimulierung bei Jodmangel ein hyperthyreoter parenchymatöser Kropf vor, später kommt es infolge von adaptiv reduziertem Schilddrüsenhormonbedarf und Jod-„Überfüllung“ zu Follikelatrophie und kolloidem Kropf (Speicher kropf) mit oder ohne Nodularität. Die Entstehung von **sporadischen (nodulären) Struma** wird auf milde Störungen des Jodstoffwechsels zurückgeführt. Die humane **Morbus Basedow** (*Graves disease*) mit diffuser Hyperplasie wird durch autoimmune stimulierende TSH-Rezeptor-Antikörper verursacht und führt zu Hyperthyreose.

### **1.5. Epidemiologie und Ätiologie der Schilddrüsentumoren**

#### **1.5.1. Humane Schilddrüsentumoren**

Schilddrüsenkarzinome sind weltweit die am häufigsten diagnostizierten malignen endokrinen Tumoren beim Menschen, mit einer Inzidenzrate von 0,8 bis 5 pro 100 000 bei Männern und 1,9 bis 19,4 pro 100 000 bei Frauen. Schilddrüsenkarzinogenese kann durch genetische, hormonelle und weitere umweltbedingte Faktoren ausgelöst bzw. begünstigt werden. Insbesondere genotoxische Effekte (DNA-Schädigung, v. a. durch Aufnahme von Radiojod-Isotopen), aber auch nicht genotoxische Mechanismen, wie durch chronischen Jodmangel hervorgerufene anhaltende wachstumsstimulierende Wirkung des erhöhten TSH-Spiegels, spielen hierbei eine Rolle (WHO, 2004).

Neben den selten vorkommenden anaplastischen Karzinomen unterteilt man die gut differenzierten malignen Schilddrüsentumoren morphologisch in das follikuläre (FK) und das papilläre Karzinom (PK), wobei letzteres den am häufigsten diagnostizierten malignen Schilddrüsentumortyp darstellt (weltweit 60 bis 80 % der Schilddrüsenkarzinome, über 90 % bei Kindern) und FK weltweit mit einem Anteil von 5 - 25 % der Schilddrüsenkarzinome beschrieben sind (WHO, 2004).

Epidemiologische Studien belegen eine statistisch aussagefähige Korrelation zwischen **Jodmangel** und erhöhter Inzidenz sowohl hyperplastischer als auch neoplastischer Schilddrüsenerkrankungen. Bei den in den Jodmangelgebieten gehäuft auftretenden malignen Tumoren handelt es sich überwiegend um FK und anaplastische Karzinome (WHO, 2004; Rosai, 2004). Im Zuge der alimentären Jodsupplementierung (Salz, Milch) ist in den letzten 20 Jahren ein starker Rückgang Jodmangel-assoziiierter Schilddrüsenkarzinome zu



## II. SCHRIFTTUM

verzeichnen, so dass es sich auch bei den in Deutschland diagnostizierten Karzinomen nahezu ausschließlich um PK handelt.

Durch interne (Jacob *et al.*, 2006) oder v. a. externe (Mizuno *et al.*, 2000) **Strahlenexposition** verursachte Schilddrüsenkarzinogenese zeigt eine enge Assoziation mit der Entstehung von PK. Bereits diagnostisch und therapeutisch eingesetzte, niedrige Strahlendosen (bei knotigem Struma, Thymusvergrößerung, Akne) können das Schilddrüsentumorrisiko erhöhen (Robbins und Schneider, 2000; Shore, 1993; Ron *et al.*, 1995). Eine Dosis-Wirkungsbeziehung besteht nachweislich bis zu einer gewissen Grenze von etwa 100 Gy beim Menschen; durch eine darüber hinaus erhöhte Dosis reduziert sich das Risiko einer Schilddrüsentumorentstehung aufgrund direkt induzierten Zelltodes wieder (WHO, 2004). Auch die Entstehung von nodulären Hyperplasien und autoimmuner Thyreoiditis (Pacini *et al.*, 1999), FA (Shore *et al.*, 1993) und FK kann mit Strahlung in Verbindung gebracht werden (WHO, 2004).

Als Auswirkung der radioaktiven Strahlenfreisetzung infolge des Reaktorunglückes von **Tschernobyl** am 26. April 1986 kam es in den Radiojod-kontaminierten Regionen zu deutlich erhöhter Inzidenz überwiegend papillärer Schilddrüsenkarzinome (PK, > 95 % der Fälle) (mehrfach publiziert, erstmals Baverstock *et al.*, 1992), mit auffällig großem Anteil erkrankter Kinder (Tronko *et al.*, 1999). Während weltweit ca. eines von einer Millionen Kindern pro Jahr erkranken, zeigten sich innerhalb einer Dekade nach dem Reaktorunglück in Weißrussland eine 30fach und in Gomel Oblast eine 100fach erhöhte Inzidenz (Williams, 2002). Die hohe Inzidenz von Schilddrüsentumoren ist auf die große Menge der freigesetzten Radiojod-Isotope  $I^{131}$  und  $I^{132}$  zurückzuführen. Diese werden in der Schilddrüse infolge der Jodkonzentrierung angereichert, weshalb die Belastung der Schilddrüse gegenüber allen anderen Organen etwa das 1000fache beträgt (WHO, 2004). Das Erkrankungsrisiko korreliert auf Grund der durch das Wachstum bedingten Zellteilungsrate, der höheren Radiojodkonzentrierung wegen vermehrter Expression der Enzyme des Jodmetabolismus (Faggiano *et al.*, 2004) und dem größeren Milchkonsum (primäre nutritive Quelle für Radiojod) negativ mit dem Alter des Organismus (WHO, 2004). Tschernobyl-assoziierte PK bei Kindern zeigen häufig solides Wachstumsmuster (93,1 %), und sind bei kürzerer Latenzzeit in stärkerem Maße als beim Erwachsenen mit Metastasierung assoziiert (Williams *et al.*, 2004). Häufig liegen gleichzeitig nicht-neoplastische Schilddrüsenerkrankungen (noduläre Hyperplasie 43,9 %, chronische Thyreoiditis 10,2 %) vor (Rybakov *et al.*, 2000). Die Rolle einer unterschwellig Jodmangelsituation in Zusammenhang mit durch Radiojodkontamination verursachter Schilddrüsenkarzinogenese in belasteten Regionen ist bislang nicht eindeutig geklärt (Robbins *et al.*, 2001; Williams, 2002).

## II. SCHRIFTTUM

### 1.5.2. Schilddrüsentumoren in der Veterinärmedizin

Unter den verschiedenen Tierarten zeigt vor allem der **Hund** eine Suszeptibilität für die Ausbildung von Schilddrüsentumoren (Dahme und Weiss, 1999). Bei spontanen neoplastischen Schilddrüsen-Erkrankungen des in der Regel älteren Hundes handelt es sich überwiegend (50 bis 90 %) um Karzinome (Capen, 2002). Das Auftreten maligner Schilddrüsentumoren zeigt beim Hund - wie beim Menschen - eine Assoziation mit der Jodversorgungslage (Kessler, 2002; Zarrin und Hänichen, 1974). Rasseprädisposition (insbesondere Boxer, Beagle, Golden Retriever) belegt eine bestehende erbliche Komponente bei der Entstehung der Erkrankung (Kessler, 2002). Bei älteren **Katzen** wird seit den 1970er Jahren zunehmend Hyperthyreose infolge eines sog. toxischen Adenoms oder einer nodulären Hyperplasie diagnostiziert (Capen, 2002; Nelson und Couto, 2003). Adenokarzinome hingegen sind bei der Katze relativ selten, jedoch liegen je nach Studie sehr unterschiedliche Angaben vor (2-5 % der Struma in den USA, 5 bis 46 % in Deutschland [Kessler, 2002]). Bei den anderen **Haussäugetieren** mit Ausnahme des Pferdes (Hillidge *et al.*, 1982) sind Schilddrüsentumoren äußerst selten vorzufinden (Capen, 2002).

### 1.5.3. Murine Schilddrüsentumoren

#### 1.5.3.1. Spontane Schilddrüsentumoren bei der Maus

Von Slye *et al.* wurden im Jahre 1926 erstmals systematische Untersuchungen zur Ermittlung der spontanen Schilddrüsentumor-Inzidenz bei Mäusen durchgeführt, wobei lediglich zwölf Schilddrüsenkarzinome bei 51 700 Mäusen diagnostiziert wurden. Wie in sämtlichen nachfolgenden Studien bestätigt, kommt es bei der Labormaus nur selten zu spontaner Entstehung von Schilddrüsentumoren, mit geringgradig höherer Inzidenz bei weiblichen im Vergleich zu männlichen Mäusen (Frith und Heath, 1984). Die Häufigkeit von spontanen Schilddrüsentumoren zeigt sich in Mauslinien-spezifischer Abhängigkeit, so dass Werte zwischen 0,13 % bei weiblichen BALB/c- und 8,6 % bei weiblichen C3H-Mäusen beschrieben sind (Frith und Heath, 1984). Über die in der vorliegenden Studie vorherrschende Untersuchungsgruppe der H6F1-Mäuse (F1-Hybride C3H x C57/BL6) finden sich verschiedenen Autoren zufolge altersabhängig (frühestens ab einem Alter von 210 Tagen) bei 0,6 bis 1,5 % der männlichen und 1,2 bis 2,1 % der weiblichen Tiere Adenome und bei maximal 0,4 % der Mäuse beider Geschlechter Karzinome (Ward *et al.*, 1979; Boorman,

## II. SCHRIFTTUM

1997; NTP, *National toxicology program*). Frith und Heath (1984) konnten überdies eine Korrelation zwischen Mauslinie und dem Wachstumsmuster der sich spontan entwickelnden Tumoren (follikulär, papillär, solide) ermitteln.

Die Entstehung nodulärer Hyperplasien ist in Zusammenhang mit jeglicher Manipulation der Schilddrüse, jedoch nur sehr selten spontan auftretend bei alten Mäusen beschrieben.

### 1.5.3.2. (Strahlen-) induzierte Schilddrüsentumoren bei der Maus

In den letzten 75 Jahren wurden mehrere Studien über Induktion von Schilddrüsentumoren bei Labormäusen durch verschiedenste äußere und innere Faktoren allein und in Kombination durchgeführt. Das Konzept der Tumor-Initiation mittels chemischen Karzinogenen oder Strahlung und der Promotion über Einflussnahme auf den TSH-Spiegel (Jodmangel, Goitrogene) findet sich in sämtlichen generierten Mausmodellen zur Schilddrüsenkarzinogenese wieder (Boltze, 2004).

Beginnend in den 1940er Jahren widmeten sich zahlreiche Forscher der Untersuchung der Einflüsse von nutritivem **Jodmangel** (Schaller und Stevenson, 1966), von verschiedenen Chemikalien (Thomas und Williams, 1992) inkl. **Goitrogenen** (z. B. Thiouracil, Diphenylthiohydantoin [Gerber *et al.*, 1994]) und **Hormonen** auf die Schilddrüse, mit dem häufigen Ergebnis, dass Substanzen trotz fehlender Genotoxizität zu Tumorentstehung beim Nagetier führen können (Hill *et al.*, 1989; Thomas und Williams, 1991 und 1999). Analog zum Menschen entstehen durch anhaltenden Jodmangel oder -übersorgung parenchymatöse bzw. kolloide Struma (Zhao *et al.*, 1998) oder noduläre Hyperplasie mit Progression zum Karzinom bei bis zu 27 % der Fälle (Schaller und Stevenson, 1966).

Bezüglich der Untersuchung der Rolle von externer und interner **Bestrahlung** auf die Schilddrüsenkarzinogenese gab es besonders in den 1960er und '70er Jahren zahlreiche Studien mittels Röntgenstrahlung bzw. Radiojod ( $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ) mit Fokus auf die Dosis-Wirkungs-Beziehung von Lindsay *et al.* (1964, 1968) und Doniach *et al.* (1963) bei Ratten und von Walinder und Sjöden (1971, 1972 und 1973) bei Mäusen. Eine gewisse „Resistenz“ der Mäuse wurde dadurch ersichtlich, dass im Gegensatz zur Ratte Radiojod-vermittelte Tumorinduktion bei der Maus nur in Kombination mit Goitrogenbehandlung oder durch Radiojodeinwirkung auf die fetale Schilddrüse möglich war (Foster, 1982; Walinder und Sjöden, 1971 und 1973). Bei zwei ähnlich der vorliegenden Studie angelegten Experimenten mit der CBA-Mauslinie erfolgte eine einmalige intravenöse Radiojod131-Injektion bei den Muttermäusen am 18ten Graviditätstag (Walinder und Sjöden, 1972 und 1973). Bis zu einem

## II. SCHRIFTTUM

Schwellenwert von ca. 7000 Rad bestand eine Dosis-Wirkungs-Beziehung im Sinne einer Dosis-abhängigen Latenzzeitverkürzung (Walinder und Sjöden, 1973) bzw. Steigerung der Tumoranzahl (Walinder und Sjöden, 1972). Je nach applizierter Dosis (zwischen 1900 und 7300 Rad) wurde eine zunehmende Inzidenz von 6 bis 22 % Adenomen und 0,9 bis 5,6 % Karzinomen beschrieben, wobei männliche Tiere in größerem Anteil betroffen waren. Unter Zugrundelegung der humanen Klassifizierung (Warren und Meissner) aus dem Jahre 1953 wurden papilläre, mikrofollikuläre und trabekuläre Adenome identifiziert. Unter den 19 diagnostizierten Karzinomen (mit trotz Invasionsneigung fehlendem Nachweis von Metastasen) befanden sich zwei PK, zehn makro- und mikrofollikuläre FK und sieben anaplastische Karzinome (pleomorph-solider, kleinzelliger und Riesenzell-Typ). Bei erhöhter Dosis (7800 rad) waren lediglich 2,7 % FA und 3,7 % FK vorhanden und eine kombinierte Anwendung von Röntgen- und Radiojodbestrahlung führte zu einer weiteren Reduktion der Tumorzinzenz (2,8 % FA; Walinder und Sjöden, 1973). Als alternativer zu Tumorentstehung führender Weg bei hochdosierter Radiojodgabe wird beschrieben, dass nach durch Bestrahlung verursachtem initialen Zelltod und Suppression der Regeneration die reaktiv vermehrte TSH-Freisetzung zu hoher Inzidenz von hyperplastischen Noduli führt, und sich laut Autor viele Adenome zweifelsfrei aus hyperplastischen Noduli durch fortschreitende pseudopapilläre Einstülpung entwickelten. Eine maligne Transformation von Adenom zu Karzinom hingegen konnte nicht festgestellt werden (Walinder und Sjöden, 1972 und 1973). Wenige der oben beschriebenen Vorgehensweise entsprechende Studien finden sich in den letzten zehn Jahren wieder. Im Zuge neuartiger Methoden zur gezielten Manipulation des (murinen) Genoms dominieren Beschreibungen von transgenen oder Knockout-Mäusen zur Induktion spezifischer Gen-assoziiierter Tumorphänotypen (s. Abschnitt 3.3.).

## **2. Pathologische Histologie der Schilddrüse bei Mensch und Maus**

### **2.1. Vergleichende Betrachtung humaner und muriner Klassifizierungsschemata der Schilddrüsentumordiagnostik**

Trotz einheitlicher Unterteilung der Läsionen in Hyperplasie, Adenom und Karzinom, weisen die Klassifizierungsschemata muriner und humaner Schilddrüsentumoren teilweise erhebliche Differenzen auf.

Die im Jahre 1974 erstmals veröffentlichte und seither regelmäßig aktualisierte **WHO-Klassifizierung** menschlicher Schilddrüsentumoren (1988, 2002, 2004) spiegelt die Intention

## II. SCHRIFTTUM

wieder, die Korrelation zwischen der histologischen Tumormorphologie einerseits und der epidemiologischen, ätiologischen, pathogenetischen und hormonell-funktionellen, insbesondere aber der klinisch therapeutisch-prädiktiven und prognostischen Bedeutung andererseits zu verbessern. Die allgemeinen Formulierungen der murinen Klassifizierungskriterien von Hyperplasie, Adenom und Karzinom stehen in Kontrast zur Präzision der Nomenklatur humaner Schilddrüsenneoplasien mit spezifischer Charakterisierung verschiedener Schilddrüsentumortypen und Definition zahlreicher Subtypen (vgl. Tab. II.1.). Die herkömmliche Unterteilung humaner Tumoren in follikuläres Adenom (FA), follikuläres Karzinom (FK), papilläres Karzinom (PK) und anaplastisches Karzinom wurde im Zuge der Ergebnisse moderner molekularbiologischer Analysemethoden beibehalten, da verschiedene karzinogenetisch bedeutsame Gene zumeist in gute Korrelation zu den unterschiedlichen histologischen Morphologien gebracht werden konnten (WHO, 2004). Doch auch in der Humanpathologie sind eindeutige Unterscheidungsmerkmale, insbesondere zwischen differentialdiagnostisch kritischen Kategorien, längst nicht zweifelsfrei definiert und etabliert (Schmid und Farid, 2006).

**Tab. II.1.** WHO-Klassifizierung und Subklassifizierung der humanen Schilddrüsenerkrankungen (WHO, 2004):

<b>Hyperplasie</b> (Rosai, 2004):	Benigne Tumoren:	Maligne Tumoren:
- diffus	<b>Follikuläres Adenom (FA):</b>	<b>Follikuläres Karzinom (FK):</b>
- multi- / nodulär (adenomatös)	<u>Wachstumsmuster:</u>	- minimal-invasives FK
<u>Funktionelle Einteilung:</u>	- normofollikulär (simpel)	- hoch-invasives FK
- kolloide Struma	- makrofollikulär (kolloidal)	<u>Varianten:</u>
- parenchymatöse Struma	- mikrofollikulär (fetal)	- Hürthle-Zell-Karzinom
<u>Ätiologische Einteilung:</u>	- trabekulär / solide	- <i>Clear-cell</i> Variante
- Morbus Basedow	(embryonal)	<b>Papilläres Karzinom (PK):</b>
( <i>Graves disease</i> )	<u>Varianten</u> (Beispiele):	<u>Varianten</u> (Beispiele):
- Dyshormonogenetischer Kropf	- Hürthle-Zell-Adenom	- Makro- und follikuläre Variante
- Endemischer Kropf	- Atypisches Adenom	- Solide Variante
- Sporadischer Kropf	- <i>Clear-cell</i> Variante	- Hürthle-Zell-Karzinom
	- papilläre Variante	- <i>Clear-cell</i> Variante
	- toxisches Adenom	- Papilläres Mikrokarzinom
	- FA mit bizarren Nuklei	- <i>Lindsay's</i> Tumor
	- Lipoadenom	<b>Schlecht differenziertes Karzinom:</b>
		- Insuläres Karzinom
		<b>Undifferenziertes Karzinom:</b>
		- squamös
		- sarkomatös (Riesen-, Spindelzell-Typ)

## II. SCHRIFTTUM

Nachfolgende Beschreibungen der **Mauspathologie** entstammen in der Regel der murinen WHO-Klassifizierung (Capen, 2001), sofern nicht anderweitig Bezug genommen wird. Während genannte Klassifizierung eine partielle Anlehnung an in der Humanpathologie gültige Kriterien darstellt, zeigen sich teilweise erhebliche Differenzen, jedoch auch zu vorhergehend in der Literatur beschriebenen Klassifizierungen bei der Maus, welche im Folgenden ebenfalls Berücksichtigung finden (Boorman, 1997 und 1999; Frith und Heath, 1984; Biancifiori, 1979). Neben vielerlei gegensätzlicher Beschreibung liegt Übereinstimmung sämtlicher Autoren diesbezüglich vor, dass die klare Unterscheidung zwischen Hyperplasie, Adenom und Karzinom nicht immer eindeutig möglich ist (Capen, 2001; Boorman, 1999).

Während in der Humanpathologie häufig davon ausgegangen wird, dass bereits zu Beginn der Tumorentstehung determiniert ist, ob es sich um die Entwicklung eines benignen oder malignen Tumors handelt (Rosai, 2004; Yeh *et al.*, 1999), konnte in Studien experimentell induzierter Schilddrüsentumoren beim Nagetier ein morphologisches Kontinuum im Sinne einer Progression von Hyperplasie über Adenom zu Karzinom beobachtet werden (Capen, 2001; Boorman, 1997; Suzuki *et al.*, 2002). Die Vorstellung der progressiven Tumorentstehung bei der Maus (Ward, 2002) findet Reflexion in der histologischen Charakterisierung der Tumoren, welche im Wesentlichen auf einer Zunahme allgemeiner Malignitätsmerkmale (Mitoseaktivität, Pleomorphismus mit variabler Zellkerngröße und Form, zelluläre und architektonische Atypien, zunehmende Zelldichte und Komplexität des Wachstumsmusters) beruht (Boorman, 1997). Dennoch darf laut WHO-Klassifizierung (Capen, 2001) die (progressive) Größe einer Läsion für die differentialdiagnostische Abgrenzung zwischen Hyperplasie, Adenom oder Karzinom kein Kriterium darstellen.

Eine Subklassifizierung der murinen Schilddrüsentumoren ist im Allgemeinen auf die Beschreibung des Wachstumsmusters beschränkt. Der Literatur zufolge können Hyperplasien zystische und / oder papilläre Formationen annehmen, Neoplasien hingegen können follikuläres, papilläres oder solides Wachstum aufweisen (Capen, 2001).

### **2.2. Altersassoziierte Veränderungen der Schilddrüse bei der Maus**

**Degenerative** altersbedingte Veränderungen sind in Mauslinien-abhängiger Inzidenz ab einem Alter von 12 Monaten beschrieben. Hierbei handelt es sich um Verlust anfärbbaren Kolloids, vermehrt interfollikuläres Bindegewebe, starke Variabilität der Follikelgröße, multiple flachepitheliale **Zysten** (Blumenthal, 1955), welche bevorzugt in der Peripherie der

## II. SCHRIFTTUM

Schilddrüse lokalisiert sind und insbesondere durch Konfluenz verschiedener Follikel als sog. Pseudozysten (Salabè, 2001) entstehen (Boorman, 1997), sowie eine generelle Zunahme des durchschnittlichen Follikeldurchmessers infolge von Dilatation (Boorman und Hardisty, 1999). Angeborene **Anomalien** sind bei H6F1-Mäusen selten. Zumeist handelt es sich um das Vorhandensein von aberrantem Gewebe im Zuge der Embryonalentwicklung. Neben fokalen Thymus-Ektopien treten insbesondere zystische Reste embryonaler Ultimobranchialkörper (UBB) regelmäßig auf (Rehm *et al.*, 1985). **Entzündliche Veränderungen** kommen bei unbehandelten Mäusen im Allgemeinen nicht vor, obwohl polymorphkernige Zellen und Makrophagen im Lumen zystischer degenerativer Follikel vorhanden sein können (Boorman und Hardisty, 1999).

### **2.3. Schilddrüsenhyperplasie (Kropf, Struma, Goiter)**

Hyperplasien sind benigne adaptive Hyperproliferationen der Thyreozyten mit daraus resultierender Hyperzellularität, welche mit klinisch erkennbarer Vergrößerung der Schilddrüse einhergehen kann (Kropf, Struma). Die Einteilung und Nomenklatur der Läsionen erfolgt anhand morphologischer Kriterien, in der Humanpathologie jedoch vorwiegend anhand Ätiologie, Pathogenese und klinischer Symptomatik (s. Abschnitt 1.4.). Eine morphologische Unterteilung kann anhand des Verteilungsmusters in diffus oder nodulär, sowie anhand der Follikelepithelmorphologie und der Menge gespeicherten Kolloids entsprechend der sekretorischen Aktivität in kolloiden und parenchymatösen Kropf vorgenommen werden.

Eine **diffuse Hyperplasie** ist definitionsgemäß durch eine gleichmäßige Beteiligung der gesamten Schilddrüse ohne erkennbare Nodularität gekennzeichnet. Je nach Art oder Zeitpunkt der Erkrankung handelt es sich um ein Überwiegen der sekretorischen oder der proliferativen Aktivität der Follikelepithelzellen. Im Sinne einer **kolloiden Struma** können zystische flachepitheliale Follikel mit großen Mengen gespeicherten Kolloids vorherrschen oder es handelt sich um zellreiche Follikel mit iso- bis hochprismatischem Epithel und geringer Kolloidspeicherung in Form einer **parenchymatösen Struma**. Die Zellkerne des einschichtigen Epithels einer Hyperplasie sind rund-oval, basalständig (WHO, 2004) und normochrom. Begleitend tritt im Allgemeinen Hypertrophie der Follikelzellen in Erscheinung (Boorman, 1997 und 1999). Darüber hinaus finden sich häufig (pseudo-) papilläre Projektionen und sog. „Foci sekundärer Proliferation“, d. h. begrenzte Ansammlungen von solide oder mikrofollikulär wachsenden Thyreozyten zwischen den Follikeln oder innerhalb

## II. SCHRIFTTUM

der Follikelwand als sog. „Sanderson Polster“. Bei der Maus zeigt sich diffuse Hyperplasie morphologisch ebenfalls als zystische Dilatation der Follikel (sog. **zystische Hyperplasie**) und / oder in Form (pseudo-) papillärer Projektionen ins Follikellumen (Capen, 2001).

Die **multi- / noduläre Hyperplasie** (NH, adenomatöse Hyperplasie) mit Formierung zelldichter Knoten kann isoliert oder gemeinsam mit diffusen Veränderungen vorkommen (Boorman, 1997). Beim Menschen herrscht zumeist makrofollikuläres Wachstum vor, oder es dominiert das Bild solider und mikrofollikulärer Noduli. (Pseudo-) papilläre Formationen sind sowohl in nodulärer als auch diffuser Struma bei beiden Spezies charakteristischerweise anzutreffen. Diese gutartigen Einstülpungen ins Lumen von zumeist dilatierten Follikeln sind mit einschichtigem, iso- bis hochprismatischem Epithel ausgekleidet. In der Humanpathologie wird beschrieben, dass es sich bei benignem papillärem Wachstum vorwiegend um sog. „Pseudopapillen“ handelt, welche im Gegensatz zu „echten Papillen“ keinen fibrovaskulären Grundstock aufweisen. Die bei der Maus beschriebenen hyperplastischen papillären Protrusionen sind unter der Annahme „fortschreitender Komplexität bei neoplastischer Progression“ stets noch klein und unverzweigt und weisen - ohne dass hier eine Unterscheidung zwischen echten und Pseudopapillen vorgenommen wird - entsprechend den Abbildungen keinen deutlichen Bindegewebsstock auf (Capen, 2001).

Das in der murinen Klassifizierung (Capen, 2001) nicht beschriebene gehäufte Vorkommen von zytologischen und nukleären Atypien - besonders in Zusammenhang mit vorheriger Strahlenexposition - kann beim Menschen die diagnostische Abgrenzung von malignen Schilddrüsentumoren erschweren (WHO, 2004). Atypien finden sich neben zellulärem Pleomorphismus (v. a. zwischen den Knoten) auch regelmäßig in Assoziation mit humanem Hormonstörungskropf. In der Mauspathologie hingegen wird das Vorhandensein von Pleomorphismus und Zellatypien in der Regel mit maligner Entartung der Zellen in Verbindung gebracht und als essentielles Diagnosekriterium herangezogen (Capen, 2001).

Schilddrüsenhyperplasien sind begleitet von einem unterschiedlichen Grad sekundärer stromaler Reaktionen (chronische mononukleäre Entzündungszellinfiltrate, Ödematisierung, Hyalinisierung, Fibrose) und degenerativer Follikelzellatrophie.

Die entscheidenden Kriterien zur diagnostischen Abgrenzung einer nodulären Hyperplasie von einem Adenom in der Humanpathologie (WHO, 2004; Rosai, 2004) sind in der derzeit gültigen murinen Klassifizierung (Capen, 2001) größtenteils analog enthalten (vgl. Tab. II.2.): Hyperplastische Noduli treten in der Regel multipel auf. Im Gegensatz zum Adenom weisen die Knoten keine oder eine nur unvollständige Kapsel auf und verursachen keine Kompression des umgebenden Gewebes. Im Falle (selten diagnostizierter) multipler



## II. SCHRIFTTUM

Adenome oder des gleichzeitigen Auftretens von Adenom und hyperplastischen Noduli ist eine histomorphologische Abgrenzung jedoch nahezu unmöglich (Rosai, 2004).

**Tab. II.2.** Gegenüberstellung der essentiellen Charakteristika zur differentialdiagnostischen Abgrenzung von einem Adenom und zusätzlich beschriebener morphologischer Eigenschaften einer nodulären Hyperplasie bei Mensch und Maus (WHO 2004; Capen, 2001). Wesentliche Unterschiede sind *kursiv* dargestellt.

	<b>Humane noduläre Hyperplasie</b>	<b>Murine noduläre Hyperplasie</b>
Anzahl der Knoten:	meist multinodulär	<i>(keine Angabe)</i>
Abgrenzbarkeit:	i. d. R. nicht gut abgrenzbar	nicht gut abgrenzbar
Kompression:	fehlende Kompression	fehlende, <i>evtl. milde Kompression</i>
Kapsel:	keine vollständige Kapsel	keine Kapsel
Architektur:	Schilddrüsen-typisch ( meist makrofollikulär)	Schilddrüsen-typisch (i. d. R. zystische Follikel)
Sonstiges:		<i>Eosinophilie des Zytoplasmas</i>
Zytologie:	variables Vorkommen von Pleomorphismus und Zell(kern)atypien	<i>kaum / kein Vorkommen von Pleomorphismus oder Atypien</i>
Wachstumsmuster:	makro-, <i>mikrofollikulär</i> , (pseudo-) papillär, <i>solide</i> , <i>Sanderson Polster</i> , <i>Foci sekundärer Proliferation</i>	follikulär zystisch und / oder (pseudo-) papillär
Papillen:	<i>Pseudopapillen</i> mit einschichtigem Epithel variabler Höhe	<i>klein und unverzweigt</i> mit einschichtigem Epithel variabler Höhe
stromale Reaktion:	variabel, bisweilen hochgradig	<i>meist schwach ausgeprägt</i>

### 2.4. Follikuläres Schilddrüsenadenom (FA)

Das follikuläre Adenom (FA) ist als “gutartiger abgekapselter Tumor mit zweifelsfrei follikulärer Differenzierung” definiert (WHO). Adenome treten (mit Ausnahme genetisch determinierter Syndrome) beim Menschen fast immer solitär auf und sind charakteristischerweise von einer bisweilen auch dünnen, aber stets kompletten Bindegewebskapsel umgeben. Bei der Maus handelt es sich analog um umschriebene, gut abgrenzbare Knoten, wobei die bindegewebige Demarkation in Form einer deutlichen Kapsel bei dieser Spezies auch fehlen kann (Boorman und Hardisty, 1999; Capen, 2001). Zudem gilt in der Mauspathologie multiples Auftreten nicht als ein das Adenom ausschließendes Kriterium. Humane und murine Adenome unterscheiden sich in ihren architektonischen und zytologischen Merkmalen eindeutig vom umgebenden gesunden Schilddrüsengewebe, welches infolge des expansiven Tumorwachstums oft Anzeichen für Kompression aufweist (s. Tab. II.3.).

Die gutartigen Tumorzellen sind iso- bis hochprismatisch oder polygonal, und zeigen zelluläre Atypien nur in milder Ausprägung. Mitotische Figuren sind nicht nachweisbar. Die

## II. SCHRIFTTUM

rund-ovalen Zellkerne sind laut Mausklassifizierung charakteristischerweise, laut humaner Klassifizierung bisweilen vergrößert, und zeichnen sich beim menschlichen FA zusätzlich durch Uniformität (meist normo- bis hyperchrom) und nicht vorhandene Überlappung der Zellkerne aus. In der murinen Klassifizierung finden sich eine Reihe weiterer, jedoch eher unspezifischer zytologischer Merkmale beschrieben: Zelluläre Hypertrophie (Frith und Heath, 1984) oder nukleäre Hyperchromasie (Boorman, 1997 und 1999) sind denselben Autoren zufolge bei Hyperplasie und Adenom gleichermaßen anzutreffen. Als distinktives Merkmal ist eine im Vergleich zur Hyperplasie erhöhte zytoplasmatische Basophilie genannt (Capen, 2001). Ein erhöhtes Kern-Plasma-Verhältnis als in der Mäuseklassifizierung formuliertes allgemeines Merkmal neoplastischer Veränderungen (Boorman und Hardisty, 1999) findet Widerspruch in der Beobachtung, dass die mikroskopischen Merkmale häufig die funktionelle Aktivität eines Adenoms widerspiegeln, d. h. hyperaktive (toxische) Adenome zeigen im Gegensatz zu kalten Knoten stark erhöhte Zellularität mit reduziertem Kern-Plasma-Verhältnis (WHO, 2004).

Im Allgemeinen sind sekundäre degenerative Veränderungen wie Hämorrhagien, Ödeme, Fibrose, Kalzifizierung und zystische Degeneration bei Mensch und Maus selten anzutreffen. Die beim Menschen vorkommenden Wachstumsmuster sind vermutlich ohne klinische Relevanz und dienen lediglich der näheren Beschreibung der Tumoren: Neben Mischformen existieren normofollikuläre (*simple*), makrofollikuläre (*kolloidale*), mikrofollikuläre (*fetale*), und trabekuläre bis solide (*embryonale*) FA. Bei der Maus hingegen ist das Adenom je nach vorherrschendem Wachstumsmuster als follikuläres, solides, aber auch papilläres Adenom zu klassifizieren (Boorman, 1997). Das **follikuläre Adenom der Maus** besteht aus kolloidhaltigen, typischerweise kleinen und vereinzelt normalgroße Follikeln. Wie in der Humanpathologie finden sich aber auch (beispielsweise von Boorman und Hardisty, 1999) Beschreibungen follikulärer Adenome mit Follikeln variabler Größe bis hin zu zystischen Wuchsformen mit entsprechender Bezeichnung als mikro-, makrofollikuläres oder zystisches Adenom. Beim (seltenen) **soliden Adenom der Maus** (Boorman und Hardisty, 1999) formieren polygonale bis längliche Zellen mit eosinophilem oder klarem vakuolisiertem Zytoplasma hyperzelluläre solide Areale oder Knoten. Meist sind kleine, wenig Kolloid enthaltende Follikel gleichzeitig nachweisbar. Das häufig bei der Maus diagnostizierte **papilläre Adenom** (Frith und Heath, 1984) wird von einer papillären Hyperplasie im Sinne der Progressionshypothese anhand komplexerer Verzweigungen der papillären Projektionen unterschieden, welche ebenfalls mit einschichtigem Überzug häufig auf Grundlage eines (zumeist zarten) fibrösen Stromas entstehen (Boorman und Hardisty, 1999).

## II. SCHRIFTTUM

Im Unterschied zur Maus finden sich in den Abhandlungen über humane Schilddrüsentumoren zahlreiche näher definierte Varianten des FA, welche der entsprechenden Literatur zu entnehmen sind (WHO, 2004; Rosai, 2004; s. Tab. II.1.). In diesem Zusammenhang sei jedoch erwähnt, dass es auch bei humanen FA neben den vorherrschenden follikulären Wachstumsformen zu Ausbildung pseudo- / papillärer Strukturen kommen kann. Bei überwiegendem Vorkommen selbiger ist die abgekapselte Läsion als papilläre Variante des FA (**FA-PV**) zu bezeichnen, und nicht - wie bei der Maus oder früher auch in der Humanmedizin üblich - als „papilläres Adenom“ (Piccoli, 1966). Papilläre Formationen in humanen FA werden beispielsweise von Mai *et al.* (2001) als fokale papilläre Hyperplasie interpretiert (FA mit papillärer Hyperplasie).

**Tab. II.3.** Vergleich der Klassifizierungskriterien für ein Schilddrüsenadenom in der Human- und Mauspathologie nach WHO (2004; Capen, 2001). Um die Diagnose Adenom zu stellen müssen generell zwingend mehrere der formulierten Kriterien zutreffen.

	<b>humanes (typisches) FA</b>	<b>murines Adenom</b>
Anzahl:	i. d. R. solitär*	(keine Angabe)
Kapsel:	vollständige Kapsel*	Kapsel evtl. vorhanden
Kompression:	Kompression des Nachbargewebes*	
Zytoarchitektur:	abweichende Zytoarchitektur vom normalen Schilddrüsenengewebe*	
Wachstumsmuster:	normofollikulär, mikrofollikulär (überwiegender Typ), makrofollikulär, trabekulär / solide	follikulär, solide und / oder papillär
Zellkerne:	rund-oval, evtl. vergrößert, eher hyperchrom	
Atypien und Mitosen:	keine bzw. kaum Mitosen, milde nukleäre Atypien möglich	
Sonstiges:	Zellkerne uniform und nicht überlappend	basophiles Zytoplasma, erhöhtes Kern-Plasma-Verhältnis, deutliche Nukleoli, einschichtiges Epithel
Varianten:	zahlreich (s. Tab. II.1.)	nicht weiter benannt

\*essentielle Charakteristika zur Abgrenzung von einer nodulären Hyperplasie

Als **atypisches Adenom** (oder „nicht-invasives Karzinom“ nach Rosai, 2004) beim Menschen wird herkömmlicherweise ein follikulärer Tumor mit auffallend zytoarchitektonischen Abnormalitäten (ausgeprägt hoher Mitoseaktivität und Zelldichte, nukleäre Atypien, Nekroseareale, atypisches solides oder trabekuläres Wachstumsmuster) bezeichnet, bei welchem sich jedoch keine Anzeichen für Invasion nachweisen lassen.

### **2.5. Gut differenzierte Schilddrüsenkarzinome**

#### **2.5.1. Humanes follikuläres Schilddrüsenkarzinom (FK)**

Beim follikulären Karzinom (FK) handelt es sich um einen „malignen Tumor mit follikulärer Differenzierung, welchem die diagnostischen PK-Merkmale (s. Abschnitt 2.5.2.) fehlen“ (WHO). Die Abgrenzung des humanen FK von einem FA hängt im Wesentlichen vom Nachweis der Invasivität ab (Kapsel-, Blutgefäßinvasion oder Invasion ins angrenzende Gewebe). Im Gegensatz zum PK treten FK fast immer solitär auf. Die Metastasierung erfolgt überwiegend hämatogen (ca. 20 % der Patienten bei Diagnosestellung), bevorzugt in Lunge oder Knochen. Das mikroskopische Spektrum reicht von follikulären kolloidhaltigen bis hin zu soliden Wuchsformen mit atypischen Arealen. Mitotische Aktivität und nukleäre Atypien sind meist vorhanden, reichen jedoch als Kriterien für Malignität nicht aus (s. atypisches FA, Abschnitt 2.4.). In Abhängigkeit vom Grad der vorliegenden Invasivität unterscheidet man beim Menschen die minimal-invasive und die hoch-invasive Form.

**Minimal-invasive FK** sind deutlich abgekapselte solitäre Tumoren, deren Zytomorphologie und Wachstumsmuster denen eines FA entsprechen. Die Kapsel eines FK ist häufig dicker und unregelmäßiger als die eines FA. Der Nachweis der Malignität erfolgt ausschließlich anhand des zweifelsfreien Nachweises von Gefäß- oder Kapselinvasion. Definitionsgemäß muss eine Kapselinvasion in voller Dicke der Kapsel nachvollziehbar sein. Die Gefäßinvasion muss Gefäße von venösem Kaliber betreffen, welche in oder unmittelbar neben der Kapsel lokalisiert sind und mindestens einen Tumorzellverband intravaskulär in Kontakt zum Gefäßendothel mit begleitendem Thrombus oder Endothelüberzug enthalten. Minimal-invasive FK zeigen in weniger als 1 (bei Kapselinvasion) bzw. 5 % (bei Gefäßeinbruch) Fernmetastasierung (Rosai, 2004). Bei fraglicher Kapselinvasion und somit nicht zweifelsfrei nachweisbarer Malignität, kann der Terminus „follikulärer Tumor unsicheren malignen Potentials“ (**FT-UMP**, *follikular tumor of uncertain malignant potential*) gewählt werden (Williams, 2000).

Die Diagnose eines **hoch-invasiven FK** ist bei abgekapselten Tumoren mit ausgedehnter Blutgefäßinvasion, welche in mindestens vier Gefäßen nachweisbar ist, ebenso zu stellen wie bei Tumoren, die hochgradig infiltratives Wachstum (Blutgefäßinvasion und Infiltration des umgebenden Gewebes) bei fehlender Abkapselung zeigen. Beide Formen sind mit einer hohen Metastasierungsrate verbunden und stehen zytoarchitektonisch oft bereits schlecht differenzierten Karzinomen nahe.

## II. SCHRIFTTUM

Zu den häufigen Subtypen des humanen FK zählen die *clear-cell* Variante und die Hürthle-Zell-Variante. Zytoplasmatische Aufhellungen im Sinne einer ***clear-cell* Variante** (verursacht beispielsweise durch Lipid-, Glykogenakkumulation, Thyroglobulinablagerung) können in jedem der mikroskopisch unterschiedenen Tumortypen vorkommen. Generell werden sie häufiger in malignen als in benignen Formen und am häufigsten sekundär infolge mitochondrialer Schwellung und Anhäufung in den sog. **Hürthle-Zell-Tumoren** vorgefunden. Letztgenannter Tumortyp (auch onkozytärer oder oxyphiler Tumor) ist durch den Nachweis von mindestens 75 % oxyphilen Zellen charakterisiert (Rosai, 2004). Dabei handelt es sich um Zellen, die stark eosinophile Granula im reichlich vorhandenen Zytoplasma besitzen. Einige Autoren (Rosai, 2004) beschreiben Hürthle-Zell-Tumoren aufgrund von ausreichend distinktiven morphologischen Merkmalen und biologischen Eigenschaften (z. B. stärkere Neigung zu Lymphknotenmetastasierung als FK, häufig Multizentrität) als separaten Tumortyp. Die Beibehaltung der traditionellen Zuteilung als FA-, FK- oder PK-Variante durch andere Autoren wird in der Tatsache begründet, dass bislang kein Hürthle-Zell-Tumor spezifisches Gen identifiziert werden konnte (WHO, 2004).

### 2.5.2. Humanes papilläres Schilddrüsenkarzinom (PK)

Das papilläre Karzinom (PK) ist ein „maligner Tumor mit follikulärer Differenzierung, papillärem oder follikulärem Wachstum und charakteristischen Zellkernveränderungen“ (WHO). Obwohl es auch Fälle umschriebener PK gibt, zeigen die meisten dieser Tumoren invasives Wachstum mit bisweilen extrathyroidaler Extension (25 %). Die Metastasierung (in maximal 25 % der Fälle) erfolgt überwiegend lymphogen mit Besiedelung der regionalen zervikalen Lymphknoten. Häufig liegt Multizentrität vor, welche herkömmlicherweise als intraglanduläre lymphogene Disseminierung des Tumors (Rosai, 2004), oder alternativ (33 %) als multifokale Tumorentstehung betrachtet wird (Sugg *et al.*, 1998; Moniz *et al.*, 2002).

Das klassische papilläre Karzinom bildet analog zur Nomenklatur zahlreiche, komplex verzweigte, „echte“ Papillen mit fibrovaskulärem Grundstock, welche von ein- oder mehrlagigen kubischen bis zylindrischen Epithelzellen mit gestörter Polarität überzogen sind. Fast immer findet sich gleichzeitig follikuläres Wachstum in unterschiedlichem Anteil (bis hin zur follikulären Variante, s. u.). Die solide Variante resultiert aus einem Überwiegen proliferativer gegenüber sekretorischer Aktivität und die konträre makrofollikuläre Variante ähnelt hyperplastischen Knoten mit dilatierten unregelmäßigen Follikeln.

## II. SCHRIFTTUM

Das entscheidende diagnostische Kriterium ist das gleichzeitige Vorhandensein mehrerer PK-charakteristischer Zellkernveränderungen. Hierzu gehören die sog. „Milchglaszellkerne“ (*ground glass nuclei*, auch *Orphan Annie Eye Nuclei* [DeLellis, 1993]), verdickte unregelmäßige Zellkernmembranen mit longitudinalen Kerben, nukleäre Pseudoinklusionen und Überlappungen der Zellkerne. Diffus auftretende „Milchglaszellkerne“ sind das spezifischste, jedoch kein pathognomisches Merkmal für die Diagnose eines PK oder einer seiner Varianten. Es handelt sich um optisch leere Zellkerne mit infolge peripherer Chromatinakkumulation unregelmäßig verdickt erscheinender Kernmembran (Hapke und Dehner, 1979). Sie sind häufig vergrößert, oval-länglich, und enthalten meist unauffällige randständige Nukleoli. Die Abhängigkeit der Darstellungshäufigkeit von Schnittdicke, Qualität, Art und Dauer der Probenfixierung ist hinlänglich beschrieben (Naganuma *et al.*, 2000), und bei der Interpretation zu berücksichtigen (WHO, 2004). Die typischen nukleären „Kerben“ kommen durch Einstülpung der vermehrt vorhandenen Kernmembran zustande und sind von artifiziellem „linienziehenden“ Chromatin zu unterscheiden (Gould *et al.*, 1989). Nukleäre Pseudoinklusionen repräsentieren zytoplasmatische Invaginationen und erscheinen als scharf begrenzte azidophile Kerneinschlüsse. Typischerweise liegen die Zellkerne eines PK dicht gedrängt und überlappend.

Trotz malignen Verhaltens sind in den meisten PK Mitosen in nur geringer Anzahl zu finden. Über die Hälfte der papillären Karzinome zeigen exzessive Fibrose. Psammom-Körperchen gehören ebenfalls zu den PK-charakteristischen Merkmalen. Es handelt sich hierbei um lamellenartig konzentrische, basophile Verkalkungsherde, die infolge von Einzelzellnekrosen unter Beteiligung von Osteopontin-produzierenden Makrophagen entstehen.

Die Diagnose der zahlreichen in der Literatur beschriebenen PK-Varianten mit analogem biologischem Verhalten basiert vorrangig auf dem Vorhandensein der PK-typischen Zellkernveränderungen. Hervorzuheben ist das **papilläre Mikrokarzinom**, welches in der Regel als Zufallsbefund bei bis zu 25 % der resezierten Schilddrüsen (Fink *et al.*, 1996) oder bei Autopsien registriert wird (Piersanti *et al.*, 2003). Es weist, meist in sternförmiger Konfiguration, definitionsgemäß die Größe von maximal einem Zentimeter auf. Die zytologischen Merkmale stimmen mit denen eines PK vollständig überein. Während papilläre Mikrokarzinome bei adulten Personen stets mit einer von der übrigen Bevölkerung nicht abweichenden Überlebensrate assoziiert sind, liegen gegensätzliche Erfahrungen insbesondere bei Tschernobyl-assoziierten Fällen von Mikrokarzinomen bei Kindern vor (hohe lymphogene Metastasierungsrate), so dass vorgeschlagen wird, den Terminus „papilläres

## II. SCHRIFTTUM

Mikrokarzinom“ ausschließlich bei adulten Patienten anzuwenden (Williams, 2000), bzw. die Neoplasie bei Kindern als „papillären Mikrotumor“ zu bezeichnen (Rosai, 2003).

Die erstmals 1960 von Lindsay beschriebene follikuläre Variante des PK (**PK-FV**) zeigt (nahezu) ausschließlich follikuläres Wachstumsmuster und fast immer infiltratives Verhalten, ist jedoch selten als sog. **Lindsay's Tumor** abgekapselt. Bei Diagnose eines FV-PK sollten in Abgrenzung zum FA oder FK die PK-typischen Zellkernveränderungen deutlich entwickelt und weit verbreitet im Tumor zu erkennen sein. Für ein FA sind die zerstreute Verteilung der PK-typischen Zellkerne und ein Anteil von unter 33 % neben Abkapselung, zytologischer Uniformität und fehlender Metastasierung als Kriterien formuliert, um Überinterpretation zu vermeiden (Mai *et al.*, 2001).

Follikulär wachsende abgekapselte Tumoren mit fraglichem Vorhandensein der PK-typischen Zellkernveränderungen können entsprechend dem Vorschlag von Williams (2000) als gut differenzierte Tumoren - ohne weitere Spezifizierung (**WDC-NOS**, *well-differentiated carcinoma - not otherwise specified*) bei eindeutiger Kapselinvasion, bzw. als **WDT-UMP** (*well-differentiated tumor of uncertain malignant potential*) bei fraglicher oder fehlender Kapselinvasion bezeichnet werden. Baloch und LiVolsi (2002) erweiterten die Nomenklatur follikulärer Schilddrüsentumoren um den Begriff „Hybrid-Tumor“ als Bezeichnung für solitäre abgekapselte invasive Tumoren mit PK-verdächtigen Zellkernveränderungen.

### 2.5.3. Murines (follikuläres) Schilddrüsenkarzinom

Weder die Unterteilung in FK und PK, noch die Unterscheidung des Grades der Invasivität spielen in der Mauspathologie eine Rolle. Zur Beurteilung der Malignität werden allgemeingültige Kriterien herangezogen, insbesondere invasives Verhalten, sowie architektonische und zelluläre Atypien. Die laut WHO-Klassifizierung essentiellen Kriterien sind Tab. II.4. zu entnehmen. Charakteristischerweise zeichnet sich das follikuläre Karzinom durch schlechte Abgrenzbarkeit oder deutlich invasives Verhalten in angrenzende Gewebestrukturen aus. Bei vorliegender vaskulärer, kapsulärer oder lokaler Invasivität ist eine Fernmetastasierung dennoch nicht notwendigerweise detektierbar (Capen, 2001). Die geringe Metastasierungsneigung muriner Schilddrüsenkarzinome ist in den meisten Abhandlungen sowohl über Spontantumoren (Frith und Heath, 1984; Biancifiore, 1979) als auch über verschiedentlich induzierte Tumoren bestätigt (Walinder und Sjöden, 1971, 1972 und 1973; Jhiang *et al.*, 1996). Obwohl die (progressive) Größe einer Läsion laut WHO-Klassifizierung für die differentialdiagnostische Abgrenzung zwischen Hyperplasie, Adenom

## II. SCHRIFTTUM

oder Karzinom kein Kriterium darstellen darf, zeichnen sich einigen Autoren zufolge Karzinome dadurch aus, dass sie infolge extensiver Proliferation im Allgemeinen größer als Adenome sind (Boorman und Hardisty, 1999; Frith und Heath, 1984). Zur Differenzierung vom Adenom kann unter anderem der Nachweis vorhandener Fibroplasie in der Peripherie des Tumors und im umgebenden Gewebe dienen, wobei auch Fälle mit deutlicher bindegewebiger Abkapselung existieren. Im Kontrast zu den benignen Läsionen mit durchwegs einschichtigem Follikelepithel, ist das maligne Wachstum durch Bildung mehrerer Epithelschichten gekennzeichnet. Die Tumorzellen sind zudem gruppenweise in soliden Haufen organisiert. Neben dem überwiegend soliden Wachstumsmuster der malignen Tumoren treten papilläre und / oder follikuläre Formationen ebenfalls auf. Die Unterteilung in follikuläres, papilläres und solides Karzinom wird entsprechend des vorherrschenden Wachstumsmusters vorgenommen.

Die gleichsam dem Adenom oft vergrößerten Zellkerne sind rund bis oval und in manchen Karzinomen können „optisch leer erscheinende“ (Capen, 2001) Zellkerne vorkommen. Das Vorhandensein zahlreicher Mitosefiguren ist nicht zwingend erforderlich, wohingegen Zellkernatypien und Polymorphismus zu den essentiellen Charakteristika gehören.

Bei den nicht in der WHO-Klassifizierung beschriebenen sekundären Veränderungen in Zusammenhang mit malignen Schilddrüsentumoren handelt es sich um Nekroseareale, Hämorrhagien und Entzündungszellinfiltrate, welche von anderen Autoren in Karzinomen in großer Ausdehnung dokumentiert sind (Boorman und Hardisty, 1999; Jokinen und Botts, 1994).

**Tab. II.4.** Differenzierung zwischen follikulärem Adenom und Karzinom bei der Maus (Capen, 2001):

	<b>Adenom</b>	<b>Karzinom</b>
Demarkation:	gut abgrenzbar	schlecht abgrenzbar
Invasion:	nicht nachweisbar	deutlich nachweisbar
Follikelepithel:	einschichtig	mehrschichtig
Fibroplasie ohne Kapselbildung:	nicht vorhanden	evtl. vorhanden

**Hürthle-Zell-Tumoren** sind in murinen Klassifizierungen nicht beschrieben (Capen 2001), obwohl diese Terminologie auch in der Maupathologie bereits verschiedentlich angewandt wurde (Biancifiori, 1979). Aufgrund der Ähnlichkeit der beschriebenen Morphologien liegt jedoch die Annahme nahe, dass es sich bei den diagnostizierten Hürthle-Zell-Tumoren und den soliden Tumoren anderer Autoren um Synonyme handelt (Frith und Heath, 1984).



### 2.5.4. „Murines papilläres Schilddrüsenkarzinom (murines PK)“

Abgesehen von der in der WHO-Klassifizierung (Capen, 2001) beschriebenen papillären Wuchsform des murinen Schilddrüsenkarzinoms (s. o.) liegen von verschiedenen Autoren Beschreibungen muriner PK mit Ausbildung der dem humanen Tumor entsprechenden charakteristischen Zellkernveränderungen vor. Es handelt sich zumeist um transgene Mausmodelle (Abschnitt 3.3.) mit **ret/PTC-**, **TRK-T1**-Rearrangierung (Russel *et al.*, 2000) oder *ret*-Mutation (entsprechend der humanen multiplen endokrinen Neoplasie MEN 2A; Reynolds *et al.*, 2001). Die bei *ret/PTC1*-Mäusen beobachteten, invasiv wachsenden Tumoren mit gemischt follikulär-solidem Wachstum und vereinzelt papillären Formationen weisen Zellkerne variabler Größe und unregelmäßiger Form auf. Sie zeigen „relativ häufig“ longitudinale Kerben in vesikulären Zellkernen und „gelegentlich“ zytoplasmatische Kerneinschlüsse (Jhiang *et al.*, 1996; Santoro *et al.*, 1996). Powell *et al.* (1998, 2001) konnten dieselbe Assoziation von *ret/PTC3* mit solidem Wachstum in 30 % der Mausmutanten feststellen, die auch beim Menschen existiert (vgl. Abschnitt 3.2.2.3.). Einige sowohl der *ret/PTC1*- als auch der *ret/PTC3*-Mutanten entwickeln überdies ausgeprägte hyperplastische Veränderungen. Ledent *et al.* (1995) beschrieben in einer transgenen Maus mit **Rb**-Suppression ebenfalls das Auftreten von „PK-typischen Zellkernveränderungen“ im Rahmen einer progressiven Entwicklung gut differenzierter Knoten mit zunehmender Malignität aus parenchymatösen Struma. Die heterogenen Knoten mit variablem Wachstumsmuster und Zellmorphologie sollen hierbei teils Ähnlichkeit mit humanen PK, teils mit humanen FK aufweisen. Mit Ausnahme der *ret/PTC3*-Mutanten erfolgt keine (lymphogene) Fernmetastasierung der Tumoren. Auch in Artikeln über nicht-transgene Mäuse wird über „Milchglaszell“-ähnliche Veränderungen berichtet. Zum Beispiel wurden in einer Studie von Walinder und Sjöden (1972, s. Abschnitt 1.5.3.2.) anhand vesikulärer Zellkerne zwei Fälle von insgesamt 700 Radiojod-behandelten Mäusen mit PK diagnostiziert.

### 2.5.5. Zusammenfassung: Gut differenzierte Tumoren bei Mensch und Maus

Ein zusammenfassender Vergleich humaner und muriner Klassifizierung von gut differenzierten Schilddrüsenkarzinomen ist Tab. II.5. zu entnehmen.

## II. SCHRIFTTUM

**Tab. II.5.** Gegenüberstellung der Charakteristika humaner und muriner Schilddrüsenkarzinome:

	<b>humanes FK und PK (WHO, 2004)</b>	<b>murines Karzinom (Capen, 2001)</b>
Subtypen:	zahlreich (vgl. Tab. II.1.)	je nach vorherrschendem Wachstumsmuster
Wachstumsmuster:	FK: solide, trabekulär, meist follikulär PK: papillär (echte Papillen), meist gemischt	solide (verherrschend), papillär (unregelmäßige Papillen), follikulär (unregelmäßige Form)
Sonstiges:		Mehrschichtigkeit, Unregelmäßigkeit Desorganisation, solide Cluster
Anzahl:	FK: meist solitär PK: oft multizentrisch	(keine Angaben)
Kapsel:	FK: gut abgrenzbar mit Kapsel PK: i. A. schlecht abgrenzbar, invasiv	schlechte Abgrenzbarkeit essentiell, Kapsel variabel
stromale Reaktion:	PK: 50 % exzessive Fibrose	häufig Fibroplasie und sekundäre Veränderungen (Nekrose, Entzündung)
Invasivität:	FK: essentielles Charakteristikum	essentielles Charakteristikum
Metastasierung:	FK: meist hämatogen (20 %) PK: lymphogen (25 %)	selten
Mitosen:	FK: zahlreich PK: meist wenige	variabel
Zellkernatypien:	meist nachweisbar (aber auch bei benignen Läsionen oft)	charakteristischerweise vorhanden, zusammen mit Pleomorphismus
„PK-Zellkerne“:	FK: bisweilen mild fokal vorhanden PK: essentielles Charakteristikum	„optisch leer erscheinende“ Nuklei variabel
Vorläufer-Läsion:	FK: möglicherweise FA PK: keine bekannt	noduläre Hyperplasie, Adenom
<b>PK:</b>	Def.: Tumor mit PK-typischen Nuklei	<b>„murines PK“:</b> analog definiert
<b>Hürthle-Zell-Tumor:</b>	Def.: oxyphile Zellen	analog definiert (evtl. analog solider Tumor)

### **2.6. Undifferenzierte (anaplastische) Schilddrüsenkarzinome bei Mensch und Maus**

Humane anaplastische Karzinome sind definitionsgemäß „hochmaligne Tumoren, welche teilweise oder vollständig aus undifferenzierten Zellen zusammengesetzt sind“ (WHO, 2004). Entsprechend der überwiegenden Zusammensetzung unterscheidet man zwischen squamösem (epithelalem) und sarkomatösem (Spindelzellen oder Riesenzellen) Typ.

Die Existenz anaplastischer Schilddrüsentumoren bei der Maus findet sich in der WHO-Klassifizierung nicht belegt. In älteren Artikeln jedoch sind verschiedentlich als anaplastisch klassifizierte Tumoren beispielsweise kleinzelligen, riesenzelligen und pleomorph soliden Typs (Walinder und Sjöden, 1972), sowie sog. **Karzinom Sarkome** (Biancifiori, 1979) beschrieben. Letztere Bezeichnung ist laut humaner WHO-Klassifizierung heute nicht mehr gebräuchlich, da ein Tumor mit epithelialer Komponente stets als anaplastisches Karzinom bezeichnet wird. Zudem stellten sich die früher beim Menschen zur Kategorie der anaplastischen Karzinome gezählten **kleinzelligen Karzinome** in überwiegender Zahl als maligne Lymphome heraus (WHO, 2004).

### **3. Genetik: Molekulare Eigenschaften der Schilddrüsentumoren**

#### **3.1. Allgemeine molekulare Mechanismen der Karzinogenese**

Eine neoplastische Zelle ist durch autonome Hyperproliferation bei fehlender Sensitivität gegenüber wachstumshemmenden Signalen, unbegrenztem replikativem Potential und Apoptosehemmung gekennzeichnet. Hinzu kommen Förderung der Angiogenese, sowie Fähigkeit zu Gewebsinvasion und Metastasierung als essentielle Eigenschaften maligner Tumoren (Hanahan und Weinberg, 2000).

Die initialen Mutationen, die zu neoplastischer Transition einer gesunden Zelle führen, können auf DNA-Schädigung durch umweltbedingte Faktoren (chemische Karzinogene, Strahlung), virale Onkogene, auf Spontanmutationen (Chromosomale Veränderung, Punktmutation) oder auf eine aus Keimbahnmutation resultierende angeborene Tumorprädisposition zurückzuführen sein. In Zusammenhang mit Tumorentstehung und Progression kommt es zu Akkumulation mehrerer genetischer Alterationen (Zellzyklus-, Apoptose-, DNA-Reparatur-, oder Wachstumssignal-Gene betreffend). Hierbei gelten insbesondere der Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen oder die Überexpression / Überfunktion von Onkogenen als die entscheidenden auf genetischen Aberrationen beruhenden Mechanismen der Tumorinduktion und Progression.

##### **3.1.1. Genmutationen - „Genmutationshypothese“**

Den sog. Tumorgenen kommt im Sinne der Genmutationshypothese bei der Tumorentstehung eine zentrale Rolle zu. Hierbei entsteht aus einer Krebsvorläuferzelle im Laufe der Tumorprogression eine Anhäufung von Mutationen verschiedener Tumorgene, welche der Zelle jeweils einen Selektionsvorteil (beispielsweise durch Fähigkeit zu invasivem Wachstum) verschaffen (Hanahan und Weinberg, 2000). Allgemein gilt, dass Tumorentstehung nicht durch eine einzige Mutation hervorgerufen werden kann (Vogelstein und Kinzler, 2004). Vielmehr steht eine Tumorzelle am Ende eines mehrschrittigen genetischen Prozesses, wobei die Anzahl und Art der Veränderungen in Abhängigkeit vom Tumortyp erheblich variieren können (Komarova *et al.*, 2003). Die bei Tumorprogression zumeist rasche Akkumulation zahlreicher Genmutationen wird von Fearon und Vogelstein (1990) durch das Vorliegen genetischer Instabilität der Tumorzellen erklärt. Die dadurch erhöhte Mutationsrate führt zunehmend zu genetischer Heterogenität und malignem Potential des Tumorklons (Nowell, 2002). Obwohl die erforderliche Anzahl beteiligter Gene zum

## II. SCHRIFTTUM

Erlangen tumoröser Eigenschaften einer Zelle variiert, können Mutationen in verschiedenen Gen-Sets zum gleichen Phänotyp führen.

### 3.1.2. Einteilung der an der Karzinogenese beteiligten Gene (Tumorgene)

Es können drei Arten von Tumorgenen unterschieden werden: Onkogene, Tumorsuppressorgene und Stabilitätsgene (Vogelstein und Kinzler, 2004).

#### 3.1.2.1. Onkogene

Onkogene, welche den Übergang vom normalen Wachstumsverhalten der Zelle zu ungebremstem Tumorwachstum induzieren können, entstehen durch Amplifikationen oder Mutationen in sog. Protoonkogenen, deren Proteine überwiegend an der Regulierung von Zellwachstum und / oder Zelldifferenzierung beteiligt sind. Die Protoonkogene können analog zu ihren Transkriptionsprodukten verschiedenen Gruppen zugeordnet werden, z. B. Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktor-Rezeptoren, intrazelluläre Signaltransduktoren (G-Proteine, *ras*), Zellzyklusregulatoren (Proteinkinasen, z. B. Tyrosinkinasen, *CDK*), nukleäre Regulatorproteine (Transkriptionsfaktoren, *myc*, *fos*) oder Virus-Onkogene (Capen, 2002).

Der Entstehung von Onkogenen können folgende Mechanismen zu Grunde liegen:

- Punktmutation des Protoonkogens mit daraus resultierender Regulator-unabhängiger Aktivierung des Genproduktes (z. B. *ras*-Mutation bei FA und FK [Shi *et al.*, 1991], *Braf*-Mutation bei PK [Nikiforova *et al.*, 2003]).
- Chromosomale Translokation, welche ein überexprimiertes Fusionsprotein zur Folge hat, bzw. welche das Protoonkogen unter den Einfluss einer regulatorischen DNA-Sequenz (aktivierende Promotoren) bringt, die übermäßige Proteinbiosynthese nach sich zieht (z. B. *ret*-Rearrangierung bei PK [Fagin, 2002, Santoro *et al.*, 2002]).
- Gen-Amplifizierung infolge von Aneuploidie oder infolge fehlerhafter DNA-Replikation einzelner Chromosomenabschnitte und somit erhöhter Produktion des strukturell normalen Proteins (Stark, 1993).

Die Fehlfunktion eines Allels ist bereits ausreichend, um die pathogene Wirkung des Onkogens zu entfalten (dominante Wirkung), bzw. die Wahrscheinlichkeit für maligne Entartung zu erhöhen.

### 3.1.2.2. Tumorsuppressorgene - „2-Treffer-Modell“ nach Knudson

Tumorsuppressorgene (TSG) können als Gene definiert werden, welche Tumorentstehung verhindern, bzw. die Wahrscheinlichkeit reduzieren, dass eine Zelle neoplastisch entartet, indem die von ihnen kodierten Proteine kontrollierenden Einfluss auf den Zellzyklus haben oder Apoptose induzieren. Detailliert handelt es sich um Proteine, welche beispielsweise die Genexpression von Wachstumsfaktoren unterdrücken (Zellzyklus-Hemmung), bei DNA-Schädigung den Zellzyklus für einsetzende Reparaturmechanismen anhalten bzw. Apoptose induzieren oder Metastasierung von Tumorzellen via Beteiligung an der Zelladhäsion verhindern. Das bekannteste und in vielen Tumoren identifizierte TSG **p53** beispielsweise reagiert auf DNA-Schädigung mit Induktion von Zellzyklus-Arrest bzw. Einleitung der Apoptose (Sherr, 1996).

Basierend auf statistischen Untersuchungen am kindlichen (vererbten) Retinoblastom entwickelte Knudson (1971) das „2-Treffer-Modell“, wonach beide Allele des Tumorsuppressorgens *Rb1* mutiert sein müssen, um eine maligne Transformation der Zelle zu induzieren (rezessive Wirkung). Im Falle eines Funktionsverlusts von nur einem Allel erhöht sich lediglich die Tumorsuszeptibilität. Bei angeborener Tumorerkrankung ist der Verlust des ersten Allels auf Keimzell-, der des zweiten auf somatische Mutation zurückzuführen. Letztere treten bei nicht vererbten Erkrankungen zweifach aufeinander folgend auf. Ursächlich für die Allel-Funktionsverluste kommen Aneuploidie infolge *Nondisjunction*, chromosomale Deletion oder Insertion, Punktmutation, Ersatz des intakten Allels durch Gen-Konversion oder mitotische Rekombination, oder epigenetisches *Silencing*, z. B. (Promotor-) Hypermethylierung (Garinis *et al.*, 2002) in Frage.

Davon abweichend existieren einige Studien über sog. „haploinsuffiziente“ TSG, v. a. bei der Maus. Hierbei führt der Verlust eines der beiden Allele infolge verminderter „Dosis“ des Transkripts bereits zu Tumorentstehung bzw. in additiver Kollaboration mit anderen mutierten Tumorgenen zu Tumorprogression (z. B. *p27*, *Arf*, *Pten*; Sherr, 2004).

In großer Häufigkeit wurden somatische Verluste des Retinoblastom-Suszeptibilitätsgens ***Rb1*** in verschiedenen humanen Tumoren, wie Osteosarkom oder kleinzelligem Lungentumor, aber auch in malignen Schilddrüsentumoren (v. a. PK) ermittelt (Anwar *et al.*, 2000). Bei der Maus führt ein *Rb1*-Verlust (konventioneller Knockout eines Allels) selten zu Retinoblastomen, sondern bevorzugt zu Hypophysen- und medullären Schilddrüsentumoren (Jacks *et al.*, 1992). Dies impliziert die Existenz von in der Retina der Maus vorhandenen kompensatorischen Mechanismen und verdeutlicht die Komplexität biologischer Signalwege.

## II. SCHRIFTTUM

Das Rb1-Protein (pRb1) ist in verschiedene zelluläre Prozesse involviert (DNA-Replikation, Differenzierung und Apoptose), insbesondere jedoch in die Zellzyklus-Regulierung als Proliferationsinhibitor (Classon und Harlow, 2002). Hierbei wird der Transkriptionsfaktor E2F1, der zur Einleitung der S-Phase erforderlich ist, als wichtigstes Zielprotein inhibiert. Demzufolge führt eine Überexpression von pRb1 zu Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase, und umgekehrt eine pRb1-Mangel zu beschleunigtem Übergang von G1- in die S-Phase. Onkogenetische Veränderungen der Rb1-Signalkaskade können unter anderem durch mutationsbedingte Inaktivierung der *Cdk2*-Tumorsuppressorgene oder Aktivierung der Onkogene *Cdk4* oder *CyclinD1* verursacht werden (Sherr und McCormick, 2002).

Die TSG **p15** (*Cdkn2b*) und **p16** (*Cdkn2a*) sind bei humanen Tumoren, insbesondere der akuten lymphoblastischen Leukämie, häufig inaktiviert. Ein *p16*-Verlust scheint bei der Entdifferenzierung humaner Schilddrüsenkarzinome gemeinsam mit weiteren Genen von Bedeutung zu sein (Ball *et al.*, 2006). Die von den *Cdkn2*-Genen kodierten Proteine p16Ink4a und p15Ink4b sind Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen (CDK), die unter dem Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren und über Aktivierung weiterer Proteine den Übertritt von G1- zur S-Phase des Zellzyklus beschleunigen (negative Regulatoren der Zellzyklusprogression). Bei Fehlen der hemmenden Wirkung durch p15 oder p16 wird somit die G1-Phase verkürzt und der S-Phasen-Eintritt dereguliert (Ragione und Iolascon, 1997).

Bei der Maus konnten die *Cdkn2*-Genorte auf Chromosom 4 und das TSG *Rb1* auf Chromosom 14 identifiziert werden (MGI-Datenbank).

### 3.1.2.3. Stabilitätsgene (*Caretaker*) - Genetische Instabilität

Wie im Falle der TSG müssen beide Allele der Stabilitätsgene mutiert sein, um zu Tumorentstehung oder Tumorprogression beitragen zu können. Inaktivierung von Stabilitätsgenen führt jedoch nicht direkt zu Tumorentstehung, sondern lediglich zu genetischer Instabilität, und damit Begünstigung klonaler Entwicklung. Die dieser Gruppe zugehörigen Gene sind in Detektion und Reparatur von DNA-Schädigungen, d. h. in *Mismatch Repair* (MMR), *Nucleotide-excision Repair* (NER), oder *Base-excision Repair* (BER) involviert (Lengauer *et al.*, 1998).

### 3.1.2.4. Tumorsuszeptibilitätsgene

Hinzu kommen die sog. Tumorsuszeptibilitätsgene, deren Allelotypen jeweils mit minimaler Penetranz das individuelle Risiko (Prädisposition) für die Entstehung sporadischer Tumoren modifizieren (Fijneman, 2005). Das durch die genetische Suszeptibilität bedingte relative Risiko verschiedener Individuen für sporadische Tumorerkrankung wird auf 10 bis 100 geschätzt. Da nicht nur Einzelgen-Effekte sondern auch multiple Interaktionen verschiedener Gene und anderer Faktoren hierbei eine Rolle spielen, sind zur Identifizierung von Kandidatengenen derart umfangreiche vernetzte und komplexe Allelotypisierungsstudien nötig, wie sie derzeit nur in Tiermodellen ansatzweise durchführbar sind.

### 3.1.3. Aneuploidie - „Aneuploidiehypothese nach Boveri“

Im Gegensatz zur „Genmutationshypothese“, welche besagt, dass Tumorprogression aus Mutationen bestimmter Tumorgene resultiert (s. o.), postuliert die „Aneuploidiehypothese“, dass der malignen Transformation primär Aberrationen der Chromosomenzahl zu Grunde liegen. Diese mehrfach diskutierte Alternative zur Genmutationshypothese (Bialy, 2001; Brinkley und Goepfert, 1998) geht auf Boveri zurück, welcher 1914 erstmals die mit Chromosomenfehlverteilungen assoziierten Veränderungen der chromosomalen Zusammensetzung ursächlich mit Tumorentstehung in Zusammenhang brachte. Begründet liegt diese Theorie darin, dass die meisten malignen Tumoren signifikante Aneuploidien aufweisen, und alleine durch das Auslösen einer Chromosomenfehlverteilung maligne Entartung induziert werden kann (Tsutsui *et al.*, 1984). Zugewinne oder Verluste ganzer Chromosomen oder von Chromosomenabschnitten verursachen demnach eine sehr große Anzahl unbalanciert vorliegender Gene, deren verändertes Zusammenspiel unabhängig von den Funktionen der einzelnen betroffenen Gene die Tumorentstehung verursacht (Duesberg und Rasnick, 2000 und 2005).

Eine Verknüpfung beider Theorien stellen die sog. „Aneuploidiegene“ dar, d. h. Gene mit Kontrollfunktion während der Mitose (Ouyang *et al.*, 2002), deren mutationsbedingte Fehlfunktion Chromosomenfehlverteilungen nach sich ziehen kann (Pihan und Doxsey, 1999). Hierzu gehören beispielsweise Gene mit Beteiligung an der chromosomalen Kondensation, Schwesternchromatid-Kohäsion, Funktion und Struktur der Kinetochore, Mikrotubuli-Formation, und Gene mit Überwachungsfunktion im Zellzyklus während S- und M-Phase, DNA-Replikation und Mitose.

### 3.1.4. Strahleninduzierte Karzinogenese

Genmutationen und chromosomale Aberrationen gelten herkömmlicherweise als *early events* der Karzinogenese und als essentielle Mechanismen der Tumorinduktion durch Strahlung, da die DNA-Schädigung linear mit der Strahlendosis und dem Tumorrisiko korreliert.

*In vitro* Experimente konnten unter Beweis stellen, dass ionisierende Strahlung Doppelstrang-Brüche der DNA verursachen kann und zudem Regionen mit erhöhter Suszeptibilität für Strahlenschädigung existieren (Barrios *et al.*, 1989; Ilyinskikh *et al.*, 1999). *Short inverted Repeats* der DNA wurden als strukturelle Bruchstellen-Kandidaten für Genamplifizierungen ermittelt (Tanaka *et al.*, 2002). DNA-Doppelstrangbrüche stellen das initiale Ereignis für Gen-Amplifizierung oder -Deletion und Rearrangierung dar, obwohl die Mechanismen bislang nur unzureichend erklärt sind (Kimmel 2006; Sankaranarayanan und Wassom, 2005). Von primär strahleninduzierten Veränderungen sind solche zu unterscheiden, welche im Zuge genetischer Instabilität bei Tumorprogression auftreten (Komarova *et al.*, 2003).

## **3.2. Schilddrüsenkarzinogenese beim Menschen anhand molekulargenetischer Eigenschaften**

### 3.2.1. Molekulargenetische (ätiologische) Profile humaner Schilddrüsentumoren

#### 3.2.1.1. Noduläre Hyperplasie (NH) und follikuläres Adenom (FA)

Die essentiellen molekularen Eigenschaften für den Wachstumsvorteil eines Adenoms sind weitgehend unbekannt (Studer und Derwahl, 1995). Der sowohl bei nodulärer Hyperplasie als auch beim FA erwiesene ätiologische Zusammenhang mit Jodmangel zeigt die pathogenetische Ähnlichkeit beider Läsionen (WHO, 2004). Darüber hinaus spiegeln die molekulargenetischen Profile beider Läsionen im Wesentlichen das einer gesunden Schilddrüse wieder. Bei toxischen Adenomen und hyperaktiven Schilddrüsen-Knoten finden sich Beschreibungen über Genmutationen im TSH-Rezeptor-Gen und einem Gen des stimulierenden GTP-Bindungsproteins (Derwahl *et al.*, 1999).



### 3.2.1.2. Follikuläres Schilddrüsenadenom und -karzinom (FA und FK)

Das FK gilt im Sinne einer linearen Tumorprogression als maligne Transformation eines FA (WHO, 2004; Segev *et al.*, 2003). Das alternative sog. *time-restricted model* der Tumorentstehung besagt, dass ein kritisches Zeitfenster existiert, in welchem ein frühes FA entweder im Sinne einer Progression in ein FK irreversibel transformiert oder zu einem Adenom im Sinne einer *end-stage lesion* wird (Schmid und Farid, 2006). Auch moderne molekulargenetische Studien konnten bislang keine alternative Signalkaskade (*Pathway*) zwischen FA und FK aufzeigen, so dass molekulare Marker (Cerutti *et al.*, 2004) auf Grund der Ähnlichkeit mit dem FA bislang unzureichend sind, die Diagnose eines FK zu stützen (Schmid und Farid, 2006).

Bei der typischsten, mit FA (Namba *et al.*, 1990) und FK (Farid *et al.*, 1994) gleichermaßen in Verbindung gebrachten genetischen Veränderung handelt es sich um Punktmutationen des *ras*-Onkogens. Da FK in Jodmangelgebieten auffallend häufig von *ras*-Mutationen betroffen sind, könnte laut Shi *et al.* (1991) Jodmangel als Regulator bei dieser Mutation eine Rolle spielen. *Ras*-Mutationen wurden darüber hinaus auch in multinodulären Hyperplasien detektiert (Krohn *et al.*, 2001).

Die zu *Pax8/Ppary*- (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*-) Onkogen führende Translokation ist ebenfalls assoziiert mit follikulären Neoplasien. Aufgrund ihres Auffindens in benignen und malignen follikulären Tumoren (Cheung *et al.*, 2003; Marques *et al.*, 2002), scheint diese genetische Veränderung alleine für die Entwicklung eines Karzinoms jedoch ebenfalls nicht auszureichen, obwohl einige Autoren eine Korrelation mit malignem Verhalten (Kroll *et al.*, 2000; Dwight *et al.*, 2003) feststellen konnten. Aufgrund des alternierenden Vorkommens von entweder *Pax8/Ppary*-Fusion (25 bis 50 %) oder *ras*-Mutation (20 bis 50 %) beim FK (Tab. II.6.) wird eine molekulare Einteilung in diese zwei Subtypen postuliert (Nikiforova *et al.*, 2003).

### 3.2.1.3. Papilläres Schilddrüsenkarzinom (PK)

*Ret*- und *TRK*-Rearrangierungen infolge von DNA-Doppelstrangbrüchen sind neben *Braf*-Mutationen die am häufigsten anzutreffenden genetischen Veränderungen des humanen PK (vgl. Tab. II.6.). Aufgrund des bestehenden Zusammenhanges zwischen Bestrahlung und Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen, und der Assoziation zwischen Translokationen

## II. SCHRIFTTUM

dieser beiden Gene und Entwicklung der PK-typischen Merkmale, erklärt sich, dass es sich bei strahleninduzierten Schilddrüsentumoren zumeist um PK handelt (WHO, 2004).

Das *ret*-Protoonkogen kodiert für einen Transmembranrezeptor mit Tyrosinkinase-Aktivität. Bei Aktivierung des *ret*-Genes durch somatische Rearrangierung infolge eines DNA-Doppelstrangbruches unterscheidet man inzwischen anhand verschiedener Fusionspartner 11 Mitglieder der sog. *ret*/PTC (*papillary thyroid carcinoma*) -Genfamilie (Klugbauer *et al.*, 2000). Einige dieser Formen werden mit bestimmten histologischen Typen des PK in Verbindung gebracht: *ret*/PTC1 ist assoziiert mit dem klassischen papillären Typ, *ret*/PTC3 wird häufig in Zusammenhang mit Strahlenexposition und insbesondere Tschernobyl-assoziierten soliden Varianten bei Kindern (80 %) identifiziert (Thomas *et al.*, 1999). Da *ret*/PTC-Rearrangierung bereits in papillären Mikrokarzinomen detektiert werden konnte, gilt sie als frühes genetisches Ereignis (Viglietto *et al.*, 1995), welches die Entstehung der PK in Assoziation mit deren charakteristischen Zellkernveränderungen verursacht. Die strikte Korrelation zwischen dem genetischen Ereignis der *ret*/PTC-Rearrangierung und dem Auftreten der papillären Karzinome wird jedoch durch verschiedene Studien widerlegt: So variiert die in der Literatur beschriebene Inzidenz von *ret*/PTC in papillären Karzinomen zwischen 0 % und 80 % (WHO, 2004). Zudem wurde fokal die mit PK-typischen nukleären Veränderungen assoziiert auftretende *ret*/PTC-Rearrangierung bei nodulärer Hyperplasie (Fusco *et al.*, 2002) und bei über 90 % der autoimmunen Hashimoto Thyreoiditis (Arif *et al.*, 2002) beschrieben. Da das Auftreten papillärer Karzinome in nodulär hyperplastisch erkrankten Schilddrüsen ebenfalls beschrieben ist, liegt die Vermutung nahe, dass es sich um fokale Frühstadien maligner PK handeln könnte (Fusco *et al.*, 2002).

Auch andere Gene der *ret*-Signalkaskade können in die PK-Entstehung involviert sein (Kimura *et al.*, 2003; Melillo *et al.*, 2005). Hierbei gilt eine *Braf*-Mutation (Nikiforova *et al.*, 2003) oder eine *AKAP9/Braf*-Fusion (Fusco *et al.*, 2005) als ein zu *ret*/PTC-Rearrangierung ätiopathogenetisch alternatives (Soares *et al.*, 2003) und als spätes Ereignis, bevorzugt bei spontanen (nicht-strahlenassoziierten) PK (Lima *et al.*, 2004, Nikiforova *et al.*, 2004) mit verschlechterter Prognose (Xing *et al.*, 2005). *Ras*-Punktmutationen sind charakteristisch für FA und FK (s. o.), treten jedoch auch bei PK insbesondere dem PK-FV (Zhu *et al.*, 2003), in nicht unerheblichem Umfang auf (17 %). Giordano *et al.* (2005) ermittelten gar ein distinktives Array-Expressionsprofil der drei (*ret*/PTC, *Braf*, *ras*) genetisch klassifizierten PK. Daneben finden sich weitere Gene beschrieben, die in die Karzinogenese des PK involviert sind: Rearrangierung des *NTRK-1*-Genes (früher *trk*) ist in etwa 10 % papillärer Karzinome nachweisbar (WHO, 2004). Fehlende bzw. reduzierte Expression des Tumorsuppressorgens

## II. SCHRIFTTUM

*Rb1*, aber auch epigenetische Ereignisse (c-Met- oder EGR-R-Überexpression, E-Cadherin-Mangel) komplettieren die molekulare Vielfalt der PK.

### 3.2.1.4. Anaplastische Karzinome

Anaplastische Karzinome zeigen eine hohe Inzidenz an *p53*-Mutationen (Fagin *et al.*, 1993), welche in gleichzeitig vorhandenen papillären Tumorkomponenten nicht nachzuweisen waren. Somit liegt der Verdacht nahe, dass diese Veränderung eine große Rolle bei der Entdifferenzierung spielt. Für anaplastische Karzinome, die aus PK hervorgegangen sind, sind *Braf*-Mutationen charakteristisch (Nikiforova *et al.*, 2003; Xing, 2005).

### 3.2.2. Allelische und chromosomale Imbalancen bei humanen Schilddrüsentumoren

Über die Häufigkeit des Auftretens von chromosomalen und Mikrosatelliten-Imbalancen bei humanen Schilddrüsentumoren liegen je nach Autor teilweise voneinander abweichende Daten vor. Im Allgemeinen sind jedoch FK im Gegensatz zum PK gehäuft von chromosomalen Imbalancen betroffen (80 %) und zeigen auch in größerem Umfang allelische Instabilitäten (Ward *et al.*, 1998; Tab. II.6.). LOH-, CGH- und ergänzende Genexpressions-Studien mit humanen FA (Oriola *et al.*, 2001), FK (Aldred *et al.*, 2004) und PK (Kimmel *et al.*, 2006) führten zur Nennung einiger gehäuft betroffener Kandidatengene (Mazzanti *et al.*, 2004), jedoch ohne erwiesene differentialdiagnostische Nutzbarkeit aufgrund fehlender Spezifität (Schmid und Farid, 2006), so dass die wenigen und zudem nicht konstant in der Mehrzahl der Fälle detektierten Veränderungen nur bedingt als Charakterisierungsmuster herangezogen werden können.

#### 3.2.2.1. Mikrosatelliten-Imbalancen

LOH- (*Loss of Heterozygosity*-) Studien mittels Mikrosatelliten-Markern ermöglichen das Auffinden des Verlusts eines einzelnen durch die Mikrosatelliten-Sonde determinierten DNA-Abschnittes mit hoher Spezifität und Sensitivität, unter der Voraussetzung, dass in dieser Sequenz Polymorphismus vorliegt. Bei Abwesenheit von Mikrosatelliten-Allelen spricht man von Verlust der Heterozygotie (LOH) oder allelischer Imbalance (AI), bei veränderter Länge des PCR-Amplifikats von Mikrosatelliten-Instabilität (MSI). Durch beide Befunde werden lokalisierte oder diffuse genomische Instabilitäten, d. h. DNA-Replikations- oder Reparatur-Defekte reflektiert (Shi *et al.*, 2006).

## II. SCHRIFTTUM

Die in der Literatur beschriebenen Häufigkeiten und Verteilungen von Mikrosatelliten-Imbalancen bei humanen Schilddrüsentumoren fallen in erster Linie durch ihre Variabilität auf. Unterschiedlich lokalisierte Deletionen zeigten sich in den verschiedenen Allelotypisierungsstudien über das gesamte Genom verteilt. Einigen Autoren zufolge sind allelische Verluste in **FK** und auch FA durchschnittlich häufiger (60 % bzw. 33 % laut Fagin *et al.*, 2002) anzutreffen als in (spontanen) PK (23 %). Hierbei korrelierte dennoch keiner der spezifischen Kandidatengenorte mit einem der verschiedenen Tumortypen (maximales Vorkommen bei 33 % der Tumortypen; Ward *et al.*, 1998), obwohl verschiedene Vermutungen geäußert wurden, dass konkrete genomische Verluste in initiale Schritte der neoplastischen Transformation gesunder Zellen (10q [d. h. q-Arm des Chromosoms 10] laut Herrmann *et al.*, 1991) oder in Tumorprogression vom FA zum FK (3p und 7q21 laut Trovato *et al.*, 2004; 7q, 11p und 22q laut Kitamura *et al.*, 2001; 3p und 10p laut Herrmann *et al.*, 1991) involviert sein sollen. Hunt *et al.* (2003 und 2004) formulierten eine differentialdiagnostische Relevanz der Anzahl vorliegender AI innerhalb der follikulären Tumoren und innerhalb der PK-Varianten. Bei den **PK** mit in der Regel diploidem Chromosomensatz wurde gehäuftes Auftreten von MSI nachgewiesen (Soares *et al.*, 1997). Aufgrund dessen und aufgrund der Neigung zu multizentrischer Verteilung klonal unabhängiger Tumoren (Shattuck *et al.*, 2005), scheint es sich beim PK um das Endprodukt weniger zu Tumorentstehung führender genetischer Schritte zu handeln (Sobrinho-Simoes *et al.*, 2005).

### 3.2.2.2. Chromosomale Imbalancen

Die komparative genomische Hybridisierung (CGH) stellt eine Methode zur genomweiten Detektion von chromosomalen Imbalancen mit guter Reproduzierbarkeit dar. Man unterscheidet die konventionelle Chromosomen-basierte CGH (cCGH) (erstmal von Kallioniemi *et al.*, 1992) und auf Microarrays basierende CGH (Array-CGH). Der Vorteil der CGH-Methode besteht darin, dass Alterationen auf gesamt-chromosomaler Ebene in einem einzigen Experiment und ohne Abhängigkeit von Sequenz-Polymorphismus nachvollzogen werden können (Oostlander *et al.*, 2004). Ganzchromosomale Veränderungen (Aneuploidien) sind ebenso erkennbar wie Abweichungen der Kopienzahl einzelner DNA-Abschnitte (Amplifizierung oder Deletion), nicht jedoch Insertionen oder reziproke Translokationen (wie bei Mosaikgen-Bildung), da die DNA-Menge hierbei unverändert vorliegt.

Eine mit 80 % der Fälle besonders große Häufigkeit von Imbalancen im CGH-Profil beim **FK**

## II. SCHRIFTTUM

konnte von Hemmer *et al.* (1998 und 1999) beobachtet werden. Vergleichsweise seltener wurden durch Belge *et al.* (2001) in weniger als der Hälfte aller FA klonale zytogenetische Aberrationen ermittelt. Vergleichende Untersuchungen zwischen humanem FA und FK zeigten im Allgemeinen weitgehende Übereinstimmungen der CGH-Profile. Doch obwohl Roque *et al.* (2003) spezifische, sowohl allein als auch gemeinsam bei FK und FA auftretende Veränderungen im konventionellen CGH-Profil formulierten, konnte die von Castro *et al.* (2001) dokumentierte signifikante Assoziation eines 15q-Verlustes mit dem FA nicht bestätigt werden.

Das **PK** besitzt in der Regel diploiden Chromosomensatz, dennoch wurde ein Zusammenhang chromosomaler Imbalancen beim PK mit aggressiverem invasivem Verhalten hergestellt (Bauer *et al.*, 2002). Hinsichtlich der Existenz und der Rekurrenz (kolokalisierte gleichartige Alterationen beim gleichen Tumortypen verschiedener Patienten) von chromosomalen Imbalancen bei strahleninduzierten humanen Schilddrüsentumoren liegen in verschiedenen Untersuchungen von **Tschernobyl-assoziierten PK** mittels CGH z. T. stark voneinander abweichende Resultate vor. Hemmer *et al.* (1999) konnten bei ihrer chromosomalen CGH-Studie lediglich Zugewinne in 12 % der PK bei adulten Personen ermitteln. In einer ersten höher auflösenden Studie mittels Array-CGH von Richter *et al.* (2004) wurde ein 30%iges Vorkommen von Zugewinnen und Verlusten mit sehr niedriger Rekurrenz detektiert und demzufolge eher als sekundäres Ereignis oder intratumorale Heterogenität interpretiert. Erst in einer kürzlich veröffentlichten Untersuchung von Kimmel *et al.* (2006) zeigte sich bei einem Vergleich strahleninduzierter Tumoren mit Spontan-Tumoren durch ein signifikant erhöhtes Auftreten chromosomaler Aberrationen und eine Rekurrenz von 60 - 77 %, dass gerade bei Exposition im Kindesalter ein primär pathogenetischer Zusammenhang mit Chromosomen-Imbalancen bei strahleninduzierten Schilddrüsentumoren bestehen könnte.

### 3.2.3. Immunhistochemische (diagnostische) Profile humaner Schilddrüsentumoren

Die ätiologische Vielfalt molekularer Stoffwechselwege der verschiedenen humanen Schilddrüsentumoren reflektiert sich in dem gleichermaßen großen Umfang diagnostisch bedeutsamer Charakteristika. In der Literatur finden sich zahlreiche Vorschläge zur Anwendung immunhistochemischer und molekularer Marker, um zwischen benignen und malignen, sowie FK und PK zu unterscheiden (Segev *et al.*, 2003). Einige dieser Marker sind nachweislich mit thyreoidalen Tumoren bzw. Tumortypen assoziiert (Rosai, 2003; Saggiorato *et al.*, 2005). Bei intermediären Läsionen jedoch ist ihre Aussagekraft sowohl einzeln als auch

## II. SCHRIFTTUM

in Kombination angewandt zumeist von differentialdiagnostisch unzureichender Spezifität (Zeiger und Dackiw, 2005).

Zu den immunhistochemisch bedeutsamen Antikörpern der PK-Diagnostik zählen allen voran Galectin-3 (Gal-3) und Cytokeratin 19 (Ck 19) mit nahezu 100%iger Nachweisrate (Tab. II.6.). Beim FK ist eine Reaktivität häufig für dieselben Marker nachgewiesen, die sich im PK positiv darstellen. Den meisten Untersuchungen zufolge handelt es sich jedoch um einen geringeren prozentualen Anteil positiver FK, einhergehend mit schwächerer Intensität der positiven Reaktion.

**Gal-3** wurde in zahlreichen Studien und in verschiedenen Kombinationen bezüglich seiner Aussagefähigkeit für die Diagnostik überprüft (Weber *et al.*, 2004; Coli *et al.*, 2002). Es gehört zu den Beta-Galactosid bindenden Lectinen, und besitzt multiple Funktionen (z. B. Zell-Adhäsion [Inohara *et al.*, 1999], Zellwachstum, neoplastische Transformation [Takenaka *et al.*, 2003] und Apoptose [Nakahara *et al.*, 2005]). Trotz Gal-3-Positivität in den meisten PK (Kawachi *et al.*, 2000) gilt die Nutzbarkeit von Gal-3-Antikörpern zur PK-Identifizierung durch unzureichende Spezifität (Weber *et al.*, 2004) als eingeschränkt (WHO, 2004), insbesondere da signifikante Reaktivität auch bei 40 bis 100 % der FK nachgewiesen wurde (Saggiorato *et al.*, 2004; Beesley und McLaren, 2002; Weber *et al.*, 2004; Coli *et al.*, 2002). Gal-3 ist demnach allgemein bevorzugt in malignen Tumoren anzutreffen (Bartolazzi *et al.*, 2001) und wurde zur Identifizierung präneoplastischer Herde in gutartigen Läsionen (Coli *et al.*, 2002), sowie zur Differentialdiagnose benigner und maligner Tumoren (Inohara *et al.*, 1999) für geeignet erklärt, obwohl andere Studien dem widersprechen (Bartolazzi und Bussolati, 2006; Martins *et al.*, 2002; Mehrotra *et al.*, 2004).

**Ck 19**-Positivität galt ursprünglich ebenfalls als Charakteristikum des klassischen PK mit hoher Spezifität (97 %) und Sensitivität (92 %) (Nasser *et al.*, 2000). In weiteren Studien jedoch erwies sich die Aussagekraft von Ck19-Positivität in der PK-Diagnostik als von fraglicher Spezifität (Cameron und Berean, 2003), da Reaktivität auch in Thyreoiditis, papillär wachsenden FA-Arealen, papillären Hyperplasien (Casey *et al.*, 2003), Morbus Basedow (Erkilic und Kocer, 2005) und bei etwa 60 % der FK (Cerilli *et al.*, 2002) nachgewiesen werden konnte. Eine Kombination beider Marker mit HBME-1-, CD44v6- oder TPO- (thyroid peroxidase) Antikörpern führt einigen Autoren zufolge zu einer verbesserten differentialdiagnostischen Aussagekraft (Casey *et al.*, 2003; Papotti *et al.*, 2005; Weber *et al.*, 2004; Bartolazzi *et al.*, 2001; Prasad *et al.*, 2004).

## II. SCHRIFTTUM

**Tab. II.6.** Häufigkeit der typischen genetischen Veränderungen beim humanen FK und PK laut WHO (2004)

	FK	PK
Assoziierte Genmutationen:	<i>PAX8/Ppary</i> -Rearrangierung (25-50 %) <i>ras</i> -Punktmutation (20-50 %)	<i>ret</i> /PTC-Rearrangierung (0-80 %), <i>TRK</i> -Rearrangierung (10 %), <i>ras</i> -Mutation (< 10 %), <i>Braf</i> -Mutation (bis zu 70 %) <i>Rb1</i> -Verlust (selten)
Immunhistochemische Marker:	Gal-3: ca. 40-100 %* Ck 19: ca. 60 %**	Gal-3: 90-100 %* Ck 19: 100 %**
Chromosomale Imbalance:	relativ häufig (80 %)	i. A. diploid
Mikrosatelliten-Imbalancen:	häufiger als bei PK	relativ häufig

\*Weber *et al.*, 2004; Coli *et al.*, 2002; \*\*Cerilli *et al.*, 2002; Casey *et al.*, 2003

### 3.3. Transgene Mausmodelle für Schilddrüsenkarzinogenese

Über murine Schilddrüsentumoren sind molekulargenetische Informationen mit Hinweis auf karzinogenetisch bedeutsame Mechanismen bei dieser Spezies bislang nur spärlich vorhanden (Ying *et al.*, 2003). Ältere Untersuchungen mit Mausmodellen (Strahlungsexposition [Radiojod, Röntgenstrahlen], Jodmangel, Goitrogenbehandlung) dienten v. a. der Ermittlung einer Dosis-Wirkungsbeziehung anhand von makroskopischen (Gewicht der Schilddrüse, Größe der Tumoren) bzw. mikroskopischen Ergebnissen (s. Abschnitt II.1.5.3.) und epidemiologischen Daten (Anzahl und Alter der Mäuse bei Tumorentstehung). Clifton (1986) folgerte hieraus eine dreiphasige Tumorentstehung mit akuter (Destruktion, intrazelluläre Reparaturmechanismen und Tumorentstehung), Latenz- und Tumorstadiumsphase.

Im Zuge zunehmenden Wissens über das Mausgenom und ob seiner gezielten Manipulationsmöglichkeit stellen Mausmodelle für humane Tumoren eine zunehmend verbreitete Methode zur Erforschung neoplastischer Prozesse dar. Die Induktion spezifischer Gen-assoziiierter reproduzierbarer Tumorphänotypen durch Generierung von transgenen (d. h. Einsetzen mutierter Gene in das Stammzellgenom) oder Knockout-Mäusen ermöglicht die Untersuchung der Funktionen einzelner Tumorgene und deren Wechselwirkungen (über Hybridkreuzung, sog. „Doppelmutanten“) innerhalb einer ansonsten unverändert vorliegenden Genexpression (Tallini und Costa, 1997).

Erstmals erfolgte der Nachweis für gezielt veränderte Genexpression in der murinen Schilddrüse (konditionelles Mausmodell) durch Ledent *et al.* (1990) durch Induktion eines Transgenes unter Kontrolle des bovinen Thyreoglobulin-Gen-Promotors. Wie im Folgenden dargestellt, bestätigen die unterschiedlichen transgenen Mausmodelle die pathogenetische Signifikanz vieler der molekularen Veränderungen, welche in klinischen Proben humaner Schilddrüsentumoren gehäuft identifiziert werden können (Tallini und Costa, 1997).

## II. SCHRIFTTUM

Aus anhaltender **TSH**-Stimulierung mittels veränderter TSH-Schilddrüsen-Rezeptoren (Ledent *et al.*, 1992; Michiels *et al.*, 1994) resultierten Hyperplasien und toxische Adenome, wobei im Gegensatz zu vorhergehenden Studien via TSH-Stimulierung durch Jodmangeldiät (Hill *et al.*, 1989; Schaller und Stevenson, 1966) keine Anzeichen für maligne Progression nachzuweisen waren (Ledent *et al.*, 1992).

Mutanten der Tyrosin-Kinase-Rezeptor-Proteine **Ret** und **TRK** (Russel *et al.*, 2000) mit humanem rearrangiertem Fusionsprotein zeigen den Autoren zufolge den Phänotypen eines papillären Karzinoms mit den dem menschlichen PK analogen Zellkernveränderungen (s. Abschnitt 2.5.4.). Demgegenüber findet sich jedoch keine Beschreibung einer murinen *ret*/PTC-Rearrangierung, weder in Zusammenhang mit Strahlenexposition noch bei anderweitig induzierten oder spontanen (Schilddrüsen-) Tumoren.

Experimentelle Ansätze bestätigen die kontrovers beschriebene Bedeutung der *ras*-Onkogene in der Humanpathologie: Transgene *H-ras*-Mäuse zeigen PK-ähnliche Tumoren und Hyperplasien, und *K-ras*-Mutanten nur Hyperplasien und Adenome in geringer Inzidenz (Santelli *et al.*, 1993). *In vitro* vergleichbar transfizierte humane Schilddrüsenzelllinien weisen hingegen bereits Dedifferenzierung auf (Monaco *et al.*, 1995). Bounacer *et al.* (2004) konnten darüber hinaus eine beim Menschen von der Maus abweichende Anzahl erforderlicher Effektorsignalkaskaden bei *ras*-induzierter Thyreozytenproliferation aufzeigen und belegten die speziesabhängige Vielfalt biologischer Stoffwechselwege. **Braf**-Mutanten entwickelten ebenfalls Schilddrüsenkarzinome (Knauf *et al.*, 2005). Bei Kombination mehrerer genetischer Mutationen (z. B. *ret*/PTC-Mutante mit *p53*-Knockout; La Perle *et al.*, 2000), oder durch zusätzliche auf die Schilddrüsen stimulierend wirkende Faktoren (z. B. Jodmangel) ist stets eine erhöhte Tumorzinzidenz und Aggressivität mit stärkerer Metastasierungsneigung und Anaplasie der Tumoren bei Mäusen beschrieben (Sagartz *et al.*, 1997; Santelli *et al.*, 1993). Hochmaligne schlecht- und undifferenzierte Schilddrüsentumoren entwickeln sich in transgenen Mäusen mit Konstrukten, die die Expression viraler Proteine in der Schilddrüse induzieren (Ledent *et al.*, 1995) und zu Inaktivierung der Tumorsuppressorgene *p53* bzw. **Rb1** führen. Letztgenannte Gene zeigen in anderen Organen der Maus einen kooperativen Effekt bei der Transformation einer gesunden in eine neoplastische Zelle (Williams *et al.*, 1994).



### **III. MATERIAL und METHODEN**

#### **1. Untersuchungsmaterial (Tierexperiment)**

Das der histologischen und molekularbiologischen Untersuchung zur Verfügung gestellte murine Schilddrüsengewebe entstammte einem Versuch zur karzinogenen Wirkung von Radiojod auf die sich entwickelnde Schilddrüse (Kollaboration mit Dr. M. Rosemann, Institut für Pathologie, GSF). Das Tierversuchsvorhaben wurde durch die Regierung von Oberbayern genehmigt (AZ 211-2531-53/01).

Die Verwendung der F1- und F2-Nachkommen (Filialgenerationen 1 und 2) von vier verschiedenen Maus-Inzuchtstämmen (C3H, C57BL/6, BALB/c und JF1) sollte hierbei das Erkennen von Unterschieden in der genetischen Prädisposition ermöglichen.

**Tab. III.1.** Verpaarungen zur Zucht der Nachkommen für die vorliegende Studie und Anzahl der insgesamt untersuchten Nachkommen (in Klammern steht die Anzahl der mit Radiojod behandelten Mäuse).

Verpaarungen	Bezeichnung der Nachkommen	Anzahl der Nachkommen
C3H/H x C57BL/6	H6F1	141 (59)
JF1 x C3H/H	JHF1	54 (31)
BALB/c x C3H/H	BHF1	33 (24)
JF1 x C57BL/6	J6F1	15 (3)
JHF1 x JHF1	JHF2	48 (31)
J6F1 x J6F1	J6F2	74 (55)
Summe:		365 (203)

Alle Muttermäuse erhielten ab der sechsten Woche vor der Verpaarung jodarmes Spezialfutter (Diät C1042, Altromin®, Jodgehalt 50 mg/kg). Etwa der Hälfte der Muttermäuse (die daraus resultierende Anzahl an Nachkommen ist Tabelle III.1. zu entnehmen) wurde am Ende der zweiten Graviditätswoche und am siebten Tag post partum das Jod-Radionuklid  $I^{131}$  als Natriumjodid in 200 µl isotonischer Kochsalzlösung intraperitoneal injiziert (111 kBq, Halbwertszeit 8,04 Tage). Die Tötung durch Kohlendioxid und Sektion der Nachkommen erfolgte bei Versuchsende im Alter von 18 Monaten, bzw. vorzeitig und unverzüglich im Falle auftretender Erkrankung oder Gewichtsverlust.

Sämtliche Schilddrüsen sowie makroskopisch verändertes Gewebe wurden - wie in den folgenden Kapiteln beschrieben - weiterverarbeitet. Zudem wurde das für die genetischen Untersuchungen benötigte Normalgewebe (Leber, Schwanzspitze) unmittelbar nach der Sektion entnommen und bei -20 °C aufbewahrt.

## 2. Histologie

### 2.1. Anfertigung der histologischen Schnittpräparate

Die Gewebeproben wurden für 48 Stunden bei Raumtemperatur in 4%igem gepuffertem Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Mit einem Mikrotom (Microm, Walldorf) wurden 2 bis 4 µm dicke Schnitte hergestellt und auf Objektträger (SuperFrost Plus, Roth, Karlsruhe) aufgezogen. Hierbei wurden für die Schilddrüsendiagnostik Transversal-Schnitte angefertigt, welche die Schilddrüse zusammen mit ihrem umgebenden Gewebe (Ösophagus, Trachea, Halsmuskulatur und Nebenschilddrüse) enthielten. Die Standardfärbungen Hämatoxylin-Eosin (HE) und Masson Trichrom erfolgten nach Romeis (1989).

### 2.2. Histologische Klassifizierung der Schilddrüsenpräparate

Die lichtmikroskopische (mit Axioplan2®, Zeiss AG mit Digitalkamera-Aufsatz HV-D25, Hitachi) Klassifizierung der murinen Schilddrüsentumoren erfolgte in Anlehnung an die derzeit bei histologischer Diagnostik gebräuchlichen humanpathologischen Kriterien, entsprechend der WHO - *Classification of Tumours* (2004), unter Berücksichtigung Maus-spezifischer Besonderheiten. Eine Übersicht über die angewandte Klassifizierung ist Tab. III.2. zu entnehmen.

**Tab. III.2.** Angewandtes Klassifizierungsschema der proliferativen Schilddrüsenläsionen der Maus:

<b>Hyperplasie</b>	<b>Adenome</b>	<b>Karzinome</b>
<u>Simple Hyperplasie</u> (SH) (diffus)	<u>Follikuläres Adenom</u> (FA)	<u>Follikuläres Karzinom</u> (FK)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• kolloide Struma</li> <li>• parenchymatöse Struma</li> <li>• Struma mit Pseudopapillen</li> <li>• Struma mit soliden Arealen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• normofollikulär</li> <li>• makrofollikulär</li> <li>• mikrofollikulär</li> <li>• solide</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• makrofollikulär</li> <li>• mikrofollikulär</li> <li>• normofollikulär</li> <li>• solide</li> <li>• papillär</li> <li>• gemischt</li> </ul>
<u>Komplexe (noduläre) Hyperplasie</u> (NH)		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• (mikro-, normo-, makro-) follikulär</li> <li>• solide</li> <li>• pseudopapillär</li> <li>• gemischt</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• atypisches Adenom</li> <li>• FA in NH</li> <li>• multiple FA</li> </ul>	
		<u>Papilläres Karzinom</u> (PK)

Der Humanpathologie entlehnte Begriffe fanden ausschließlich dann Anwendung, wenn die formulierten morphologischen Kriterien eindeutig analog auf die entsprechende Läsion bei der Maus übertragbar waren. Die Diagnosestellung wurde unter vergleichender Betrachtung zwischen den Radiojod-behandelten Mäusen (I131-Gruppe) und der Schilddrüsenmorphologie gleichaltriger Kontrolltiere derselben Mauslinie vorgenommen.

#### **2.3. Immunhistochemie (IHC)**

In Ergänzung zur Histologie wurden in 12 Fällen zusätzlich immunhistochemische Präparate angefertigt. Die verwendeten Antikörper sind in Tab. III.3. aufgelistet.

Die Immunhistochemische Färbung erfolgte halb maschinell mit dem NexEs Färbeautomaten (Ventana Medical System, CA, USA) und dem Detektionskit *i-View* DAB (Ventana Medical System, Inc., Tucson, AZ, USA) bei geringfügiger Modifizierung des Herstellerprotokolls. Zunächst wurden 1 bis 2 µm dicke Gewebeschnitte aus den Paraffinblöcken angefertigt. Nach der Entparaffinierung mit Xylol wurden die Schnitte über eine absteigende Alkoholreihe rehydriert und unter fließendem Leitungswasser gespült. Zur Antigendemaskierung erfolgte eine Hitzevorbehandlung der Schnitte für 30 Minuten bei 1000 Watt in einem mit Zitratpuffer (0,01 mol/l, pH 6, versetzt mit 0,1 % Tween20) gefüllten Mikrowellendampfdruckkochtopf. Im Anschluss wurden die Präparate in mit TBS- (pH 7,6) gepuffertem 3%igem Ziegen serum bzw. Kaninchenserum (GIBCO, Karlsruhe, Deutschland) für 20 Minuten inkubiert, um unspezifische Bindungen des zweiten Antikörpers zu blockieren. Die verwendeten mono- und polyklonalen Antikörper waren kommerziell erhältlich und gegen murine oder humane Antigene gerichtet (Tab. III.3.). Die Objektträger wurden mit jeweils 100 µl des mit *Antibody Diluent* (Ventana Medical System, Tuscon, AR, USA) verdünnten Primärantikörpers (Verdünnungen siehe Tab. III.3.) überschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert.

### III. MATERIAL und METHODEN

**Tab. III.3.** Verwendete Antikörper für die Schilddrüsen-Diagnostik:

Anikörper	Klon (Hersteller)	Verdünnung	Primärantikörper Eigenschaften	Sekundär-Antikörper
Galectin-3	A3A12 (Acris <sup>1</sup> )	1 : 160	monoklonal Maus-anti-Mensch (IgG1)	Ziege-anti-Maus
Galectin-3	9C4 (DCS <sup>2</sup> )	rtu*	monoklonal Maus-anti-Mensch (IgG1)	Ziege-anti-Maus
Cytokeratin 19	BA17 (Dako <sup>3</sup> )	1 : 200	monoklonal Maus-anti-Mensch (IgG1)	Ziege-anti-Maus
Thyroglobulin	(Dako <sup>3</sup> )	1 : 8000	polyklonal Kaninchen-anti-Mensch	Ziege-anti-Kaninchen
Calcitonin	SP17 (DCS <sup>3</sup> )	rtu*	monoklonal Kaninchen-anti-Mensch	Ziege-anti-Kaninchen
Ki67	Tec-3 (Dako <sup>2</sup> )	1 : 200	monoklonal Ratte-anti-Maus	Kaninchen-anti-Ratte

\*rtu = *ready to use*, d.h. keine weitere Verdünnung erforderlich, <sup>1</sup>Acris Antibodies, Hiddenhausen, Deutschland

<sup>2</sup>DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Hamburg, Deutschland, <sup>3</sup> DakoCytomation, Hamburg, Deutschland

Alle weiteren Schritte erfolgten maschinell mit dem NexEs Immunfärbeautomaten (Ventana Medical System, CA, USA) bei 37 °C nach Empfehlungen des Herstellers. Für die primären Kaninchen- und Ratten-Antikörper wurden die entsprechenden biotinylierten Sekundärantikörper Ziege-anti-Kaninchen IgG (Vector, Burlingame, Kanada) oder Kaninchen-anti-Ratte IgG (Dako, Hamburg, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:750 bzw. 1:300 verwendet. Bei Anwendung der monoklonalen Maus-Antikörper diente die nach Herstellerangaben durchgeführte Inkubation mit einem Maus-Anti-Maus-Kit (MoMap Kit, Ventana Medical Systems) der Reduktion unspezifischer Anfärbung des Gewebes. Hierbei erfolgte vor Inkubation des Primärantikörpers mit dem Gewebe eine Reaktion des verdünnten Primärantikörpers mit seinem biotinylierten Sekundärantikörper für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Im weiteren Verlauf wurden die freien Bindungsstellen mit Mausserum IgG 30 Minuten lang gesättigt und daraufhin die Lösung zur Inkubation über Nacht auf die Gewebeschnitte aufgebracht.

Die anschließende Prozedur im Immunfärbeautomaten beinhaltete zunächst die Blockierung der endogenen Peroxidase durch Einwirken des sog. „*i-View-Inhibitors*“ (Ventana) bei anschließender Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper. Es folgte die Reaktion mit Streptavidin-HRP (*Horseradish Peroxidase*), Einwirken des Chromogens Diaminbenzidin (DAB) und Gegenfärbung mit Hämalaun. Danach wurden die Schnitte unter fließendem Leitungswasser gespült, über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und eingedeckt (Eukitt®, Sigma-Aldrich).

Um die Adäquanz der Färbung zu bestätigen, wurden geeignete Positiv- (z. B. humane Schilddrüsentumoren) und Negativkontrollen (z. B. gesunde Maus-Schilddrüse) eingesetzt. Ein Präparat ohne Primärantikörper diente dem Ausschluss unspezifischer Bindung. Die Auswertung der Präparate erfolgte semiquantitativ im Vergleich zur entsprechenden Positivkontrolle.

## **3. Probengewinnung für die LOH- (*Loss of Heterozygosity*-) und Array-CGH- (komparative genomische Hybridisierungs-) Studien**

### **3.1. Laser-assistierte Mikrodissektion (LAM)**

Als Ausgangsmaterial diente das Formalin-fixierte in Paraffinblöcke eingebettete (FFPE) Schilddrüsengewebe von insgesamt 63 verschiedenen Mäusen, wobei bei 40 F1-Hybridmäusen (30 H6F1, sieben BHF1, drei J6F1) anschließend LOH-Studien und bei 23 F2-Mäusen (21 J6F2, zwei JHF2) Array-CGH-Untersuchungen durchgeführt wurden.

Das in die Paraffinblöcke eingebettete Schilddrüsengewebe wurde mit Hilfe eines Mikrotoms in 8 bis 10 µm dünne Scheiben geschnitten (ca. zehn Schnitte pro Fall für LOH und ca. 60 Schnitte pro Fall für CGH), und auf Polyethylen- (PEN-) Membran beschichtete Objektträger (Membrane Slides, P.A.L.M. GmbH, Bernried) aufgezogen. Die Schnitte wurden zur verbesserten Haftung über Nacht in einen Ofen bei 60 °C verbracht.

Kurz vor Beginn der Mikrodissektion wurden die Schnitte entparaffiniert und mit Hämalun angefärbt. Im Unterschied zum üblicherweise durchgeführten Färbevorgang wurde hierbei destilliertes Wasser verwendet.

#### **3.1.1. Aufbau des Gerätes**

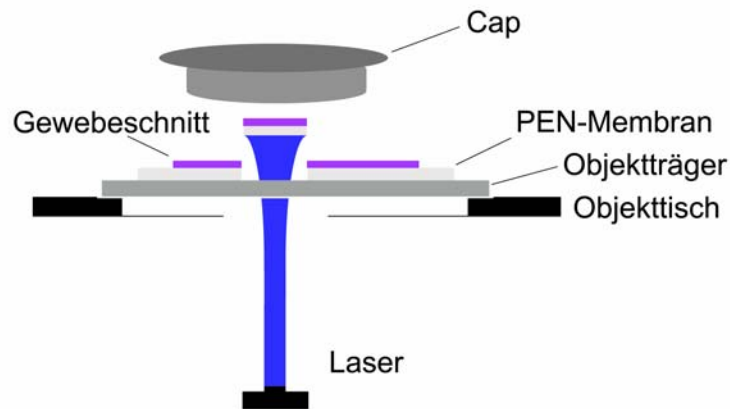
Das für die Mikrodissektion verwendete Gerät (MicroBeam Palm® Mikrolaser Technologie, Bernried) besteht im Wesentlichen aus folgenden Bestandteilen: Einem vollmotorisierten inversen Mikroskop (Axiovert 135, Zeiss AG) mit Maus-gesteuertem Objektisch, einem UV-A-Festkörperlaser, sowie Hardware und Software für die Lasereinstellungen. Es handelte sich bei der verwendeten Technik um eine Kombination aus LMM (*Laser-Microbeam-Microdissection*) und LPC (*Laser-Pressure-Catapulting*).

#### **3.1.2. Arbeitsablauf**

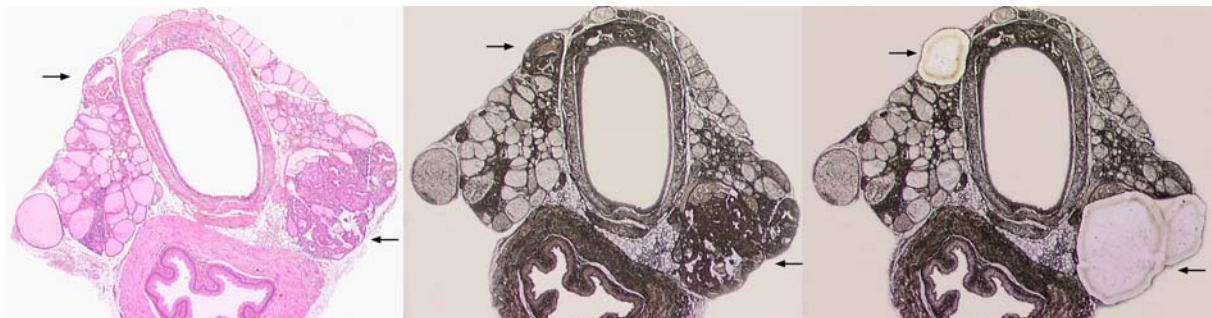
Bei 10facher Vergrößerung erfolgte die Auswahl gleichartiger Läsionen eines jeden Falles (Vgl. Abb. III.2). Bei der LMM wurde mittels eines stark fokussierten UV-Laserstrahles mit einem Fokusdurchmesser von unter einem Mikrometer das zu sezierende Areal zielgenau unter dem Mechanismus der Photoablation ausgeschnitten und anschließend per Laserdruck

### III. MATERIAL und METHODEN

(sog. Transportpuls) in den darüber befestigten, adhäsiven Deckel eines Zentrifugenröhrchens (Adhesive Caps, P.A.L.M, Bernried) befördert (LPC). (s. Abb. III.1. und III.2.).



**Abb. III.1.** Schematischer Aufbau der Laser-assistierten Mikrodissektion über LMPC-Technik (*Laser-Microbeam-Microdissection und Laser-Pressure-Catapulting*). Das ausgeschnittene Gewebestück wird mitsamt der darunterliegenden inerten Membran in den Deckel des *Adhesive Caps* katapultiert.



**Abb. III.2.** Das linke Bild zeigt den HE-gefärbten Schnitt einer nodulären Hyperplasie (NH) (Sektions-Nr. 655, 31,25x). Im mittleren Photo ist der dazugehörige Hämalaun-gefärbte Gewebeschnitt vor Durchführung der Laser-Mikrodissektion dargestellt, und auf dem rechten Bild ist das Fehlen der mittels Laser-Mikrodissektion präzise herausgeschnittenen Areale erkennbar. Die fehlende Bläuung der Hämalaun-Färbung ist auf die Verwendung von destilliertem Wasser zurückzuführen. Die verschiedenen Knoten einer NH wurden gemeinsam analysiert.

Für die Array-CGH-Studie wurden jeweils die Schilddrüsenläsion und das übrige auf den Schnitten enthaltene Gewebe als Referenzprobe (Trachea, Ösophagus, Halsmuskulatur) getrennt voneinander mikrodiseziert.

## **3.2. DNA-Extraktion**

### 3.2.1. Proteinase K-Behandlung des mikrodisssezierten Materials für die LOH-Studie

Für die weiterführende PCR-vermittelte LOH-Analyse ließ sich DNA ausreichender Qualität durch Proteinase K-vermittelte Digestion ohne weitere Aufreinigungsschritte gewinnen. Hierbei wurden jeder mikrodisssezierten Probe 40 µl SDS-Lysepuffer mittels Pipette zugegeben. Unter Einwirkung von 5 µl hinzugefügter Proteinase K [20 µg/µl] erfolgte der Verdau über Nacht im Ofen bei 60 °C. Die anschließend erforderliche Inaktivierung der Proteinase K wurde durch zehnminütiges Erhitzen auf 95 °C bewirkt.

### 3.2.2. DNA-Extraktion aus dem mikrodisssezierten Material für die Array-CGH-Studie

Für die Array-CGH wurde das durch Mikrodisssektion gewonnene Probenmaterial zunächst unter Zugabe von 1 ml 1M Natriumthiocyanat (NaSCN) über Nacht bei 37 °C vorverdaut, und anschließend mit 180 µl Buffer ATL (QIAamp Mini Kit) unter zweimaliger Zugabe von 10 µl Proteinase K [20 µg/µl] im Abstand von 24 Stunden bei 56 °C für 48 Stunden inkubiert. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels QIAamp DNA Mini Kit nach Angaben des Herstellers (Qiagen GmbH, Hilden). Die Proben wurden bis zur Weiterverwertung bei -20 °C gelagert.

### 3.2.3 DNA-Extraktion aus Schwanzspitzengewebe

Das als Kontrollgewebe dienende Probenmaterial (ca. 1 cm Schwanzspitze) wurde mit 750 µl SDS-Lysepuffer und 20 µl Proteinase K [20 µg/µl] über Nacht bei 60 °C verdaut. Nach Zugabe von 250 µl 6M Natriumchlorid und 20-minütigem Zentrifugieren (13000 rpm) wurden 800 µl in ein neues Zentrifugenröhrchen abpipettiert und durch Hinzufügen von 700 µl Isopropanol die DNA unter Schütteln ausgefällt. Das abzentrifugierte DNA-Pellet wurde getrocknet, anschließend in 500 µl 75%igem Ethanol gewaschen, erneut getrocknet und zuletzt in 100 µl Ampuwa® (RNase freies, destilliertes Wasser) aufgenommen. Durch weitere Verdünnung mit Ampuwa® bzw. Konzentrierung mittels Vakuum-Zentrifuge folgte die spektrophotometrisch (Nanodrop® Technologies, DE, USA) kontrollierte Adjustierung der DNA-Konzentration auf etwa 0,2 µg/µl für die Array-CGH und 20 ng/µl für die LOH-Untersuchung.

#### **4. Multilocus LOH-Analyse durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die sog. Mikrosatelliten sind nicht-kodierende, polymorphe DNA-Abschnitte, welche aus kurzen Tandemwiederholungen (repetitiven Nukleotidsequenzen) bestehen. Der allelische Polymorphismus solcher Loci besteht in der unterschiedlichen Anzahl der Wiederholungen (VNTR, *variable number of tandem repeats*) und somit variabler Länge des Segments. Im Falle der gezielten Kreuzung zweier Mauslinien ließ sich bei den F1-Hybriden das Vorhandensein beider Allele durch Fragmentlängenpolymorphismus nachweisen. LOH-Untersuchungen wurden bei insgesamt 30 Mäusen der H6F1-Gruppe, sowie sieben BHF1- und drei J6F1-Mäusen durchgeführt (s. Anhang Tab. VIII.3.). Neben Untersuchung der Neoplasien und einer Auswahl hyperplastischer Schilddrüsenläsionen dienten mikroskopisch unauffällige Schilddrüsen als Kontrollen. Bei einer J6F1-Maus wurden zwei verschiedene Schilddrüsenknoten getrennt voneinander analysiert.

##### **4.1. Mikrosatelliten-Marker**

Bei der Auswahl der Marker wurden bevorzugt solche ausgewählt, die auf Chromosomenabschnitten im Bereich dort lokalisierter Kandidatengene (Tumorsuppressorgene) kartieren. Polymorphe Mikrosatelliten-Marker wurden durch Primer, die in den flankierenden Bereichen beidseits des variablen, repetitiven DNA-Abschnittes binden, amplifiziert (Primer-Sequenzen siehe Anhang Tab. VIII.1.). Ein informativer Mikrosatelliten-Marker zeichnete sich in Abhängigkeit vom verwendeten F1-Hybriden (H6F1, J6F1, BHF1 oder JHF1) dadurch aus, dass die durch ihn aus Normalgewebe erzeugten PCR-Produkte deutlichen Längenpolymorphismus zwischen paternalem und maternalem Allel aufwiesen (Heterozygotie). Eine Vorauswahl der in Frage kommenden informativen Mikrosatelliten-Marker war mit Hilfe der Mausgenom-Datenbanken von NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) und MGI ([www.informatics.jax.org](http://www.informatics.jax.org)) möglich. Insgesamt wurden 36 auf neun verschiedenen Loci (Chromosomen 2, 4, 5, 6, 7, 11, 14, 15 und 19) lokalisierte Marker verwendet (s. Anhang Tab. VIII.2.). Die Marker-Längen betrugen zwischen 98 und 220 Basenpaare (bp).



#### **4.2. Polymerase-Kettenreaktion**

Pro Marker und Probe wurden 18 µl PCR-Puffer, 0,2 µl thermophile Taq-Polymerase [5 u/µl] (Biotherm), 1 µl 5'- und 3'-PCR-Primer (5 pmol/µl in Wasser) und 2 µl der extrahierten DNA-Probe (aus Abschnitt 3.2.1.) in ein PCR-Röhrchen gegeben. Die jeweils dazugehörige Positivkontrolle (Schwanzspitzen-DNA desselben Tieres, aus Abschnitt 3.2.3.) wurde mit einem Volumen von 1 µl (bei einer DNA-Konzentration von 20 ng/µl) unter denselben Bedingungen analog vorbereitet, genauso wie jeweils eine Negativkontrolle ohne DNA-Probenmaterial pro Marker.

Das Temperaturprogramm des Thermocyclers (GeneAmp®, Applied Biosystem) wurde unter Berücksichtigung des Probenvolumens von 20 µl folgendermaßen standardmäßig eingestellt: Die Initialisierung erfolgte bei 95 °C für drei Minuten. In 32 Zyklen betrugen die Temperaturen für eine Minute 95 °C (Denaturierung), eine Minute 55 °C (Primer-Hybridisierung, *Annealing*) und eine Minute 72 °C (Elongation), sowie abschließend einmalig 7 Minuten 72 °C.

#### **4.3. Agarose-Gelelektrophorese**

Die Gelelektrophorese zur Identifizierung der PCR-Produkte wurde aus den jeweils 20 µl der PCR-Produkte auf 3%igem Agarosegel (Agarosepulver [SeaKem LE-Agarose, FMC BioProducts] in 1x TBE-Puffer mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid) in TBE-Puffer durchgeführt. Als Kontrolle diente neben der aus der PCR hervorgegangenen Negativkontrolle kommerziell erhältliche standardisierte DNA-Fragmente als Längenmarker (*Molecular Weight Marker VIII*, Roche Diagnostics). Nach einer Laufzeit von mindestens 45 Minuten bei 70 bis 90 Volt wurden die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und photographiert. Anhand des Vergleichs zwischen dem Elektrophoresebild von Normalgewebe und Schilddrüsengewebe wurde auf einen gegebenenfalls vorhandenen Allelverlust (LOH) hin untersucht. Ein LOH lag bei fehlender bzw. visuell kaum erkennbarer Bande vor und eine Mikrosatelliten-Instabilität (MSI) bei einer veränderten Länge der PCR-Produkte. Bei einer vorhandenen LOH wurde die Reproduzierbarkeit des Ergebnisses in einem zweiten Experiment bestätigt.

## **5. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) für den *Rb1*-Lokus**

FISH-Analyse für den *Rb1*-Lokus wurde in acht Fällen der H6F1-Mäuse ergänzend zur LOH-Studie durchgeführt. Es handelte sich hierbei um sechs Fälle mit komplexer Hyperplasie und zwei Adenome.

### **5.1. Vorbereitung und Färbung der Rb1-FISH-Sonde**

Die DNA wurde aus dem BAC (*Bacterial artificial chromosomes*) -Klon 482 A23 (Research Genetics, Katalog-Nr. 96022) mittels QIAGEN *Large Construct Kit* (Qiagen GmbH, Hilden) nach Hersteller-Angaben isoliert.

Die anschließende Markierung der Klone erfolgte durch *Nick-Translation* mittels Nick-Translation-System (Invitrogen) wie folgt: 1 µg der isolierten Marker-DNA wurde zusammen mit 5 µl dNTP's, 5 µl Enzym-Mix (DNase, Polymerase) und 2,5 µl 11-dUTP Digoxigenin (Roche) mit Wasser zu einem Volumen von 50 µl zusammen pipettiert. Die Inkubation erfolgte bei 15 °C für 80 Minuten und wurde mit 5 µl Stopp-Puffer abgebrochen.

Für die Ethanol-fällung wurden folgende Substrate dazu pipettiert: 5 µl Herings-Sperma-DNA, 10 µg Cot1-DNA, 1/10 Volumen 3M Natriumacetat und 2faches Volumen eisgekühltes 100%iges Ethanol. Es folgte die Fällung über Nacht bei -20 °C. Anschließend wurde 30 Minuten lang bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment mit 500 µl eisgekühltem 70%igem Ethanol gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren (30 Minuten bei 12000 g und 4 °C) und Verwerfen des Überstandes wurde das DNA-Pellet bei 65 °C für ca. 15 Minuten getrocknet und in 25 µl Master-Mix (4 Teile 50%igem Dextransulfat, 4 Teile Ampuwa®, 2 Teile 20 x SSC [*Sodium Chloride-Sodium Citrate*]) und 25 µl Formamid bei 37 °C gelöst.

### **5.2. Vorbereitung der Gewebeprobe**

Die etwa 7 µm dick geschnittenen Paraffin-eingebetteten Gewebeproben wurden auf Objektträger (Superfrost plus) aufgezogen und für 24 Stunden bei 60 °C inkubiert. Danach wurden sie über eine absteigende Alkoholreihe (2 x 20 Minuten in Xylol, jeweils 5 Minuten in Isopropanol, Ethanol 100 %, 90 % und 70 %) entparaffiniert und rehydriert. Nach 5 Minuten Inkubation in PBS (pH 7,4) (Sigma) folgte eine 20-minütige Vorbehandlung in kochendem Zitratpuffer (pH 6) in der Mikrowelle bei 350 Watt; danach kamen die

Objektträger erneut für 3 Minuten in PBS (pH 7,4). Die Digestion erfolgte unter Einwirkung vorgewärmter Pronase E (50 µg/100 ml in PBS) für 5 Minuten bei 37 °C. Anschließend kamen die Schnitte 5 Minuten lang in PBS, und wurden in eisgekühltem Ethanol aufsteigender Konzentration (70, 90 und 100 %) für jeweils 3 Minuten dehydriert und bei 37 °C getrocknet.

#### **5.3. Hybridisierung und Waschschrte nach der Hybridisierung**

Die markierte DNA-Sonde aus Abschnitt 5.1. wurde auf die Gewebeproben pipettiert und beides mit einem Deckgläschen bedeckt und mit Fixogum versiegelt. Die simultane Denaturierung der Sonde und der Gewebeproben-DNA erfolgte bei 80 °C für 10 Minuten auf einer Heizplatte. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht (mind. 16 Stunden) in einer feuchten Kammer bei 37 °C.

Die Deckgläschen wurden anschließend entfernt und die Objektträger wie folgt gewaschen. dreimal 10 Minuten in 50%igem Formamid / 2 x SSC bei 43 °C, danach kamen die Objektträger dreimal 5 Minuten in 2 x SSC bei 43 °C (15 Minuten) und 5 Minuten in 0,1 x SSC bei 60 °C. Die Schnitte wurden anschließend 30 Minuten in Blockierlösung (4 x SSC, 0,1 % NP40, 3 % BSA) bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von Maus-anti-Digoxigenin-Rhodamine (Roche) (Verdünnung 1: 50 in Blockierlösung) wurde der Antikörper bei 37 °C für 90 Minuten inkubiert. Abschließend wurden die Schnitte dreimal 3 Minuten in 4 x SSC/0,1 % NP40 bei 37 °C gewaschen. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342 (15 µg/ml) (Invitrogen) für 5 Minuten und die Präparate wurden mit je einem Tropfen Vectashield® *Mounting Medium* (Vector laboratories) eingedeckelt.

#### **5.4. Auswertung der FISH-Analyse**

Die erfolgreiche Hybridisierung der DNA-Sonde an die chromosomale DNA wurde durch Fluoreszenz-Mikroskopie an einem Axiovert 200 (Zeiss) mit strukturierter Beleuchtung ApoTome (Zeiss) nachgewiesen. Die Bilder wurden mit der Zeiss Software AxioVision 4.5 bearbeitet. Die Anzahl der FISH-Signale wurde nach Überlagerung aller den Zellkern repräsentierenden Tiefschnitte bestimmt (sog. z-Stack). Es wurden bei jeder Probe insgesamt etwa 100 Zellkerne des Schilddrüsenknotens, sowie als Vergleich dieselbe Menge Zellkerne des umgebenden Kontrollgewebes (Ösophagus, Trachea, Parathyreoidea) ausgezählt.

#### **6. BAC Array-CGH-Untersuchung**

Die Array-CGH ist eine Methode zur genomweiten Detektion chromosomaler Imbalancen. Unter Verwendung von BAC-Mikroarrays, die das murine Genom vollständig und in Ein-Megabasen- (1-Mb-) Auflösung abdecken, wurden insgesamt 25 Array-CGH Analysen mit Gewebe aus 21 verschiedenen Mäusen der F2-Gruppen (JHF2, J6F2) durchgeführt (s. Anhang Tab. VIII.4.). Zwei Proben wurden mit Referenz-DNA aus frisch gefrorenem Schwanzspitzengewebe (TT; aus Abschnitt 1. und 3.2.3.) und 21 Proben mit dem aus dem Paraffinblock gewonnenen mikrodisezierten Gewebe (FFPE; aus Abschnitt 3.1.2. und 3.2.2.) hybridisiert. Bei zwei Proben wurden vergleichend je zwei Hybridisierungen durchgeführt, sowohl mit TT als auch mit FFPE als Referenzgewebe. Die folgende Abbildung stellt den schematischen Ablauf der Array-CGH-Studie dar.

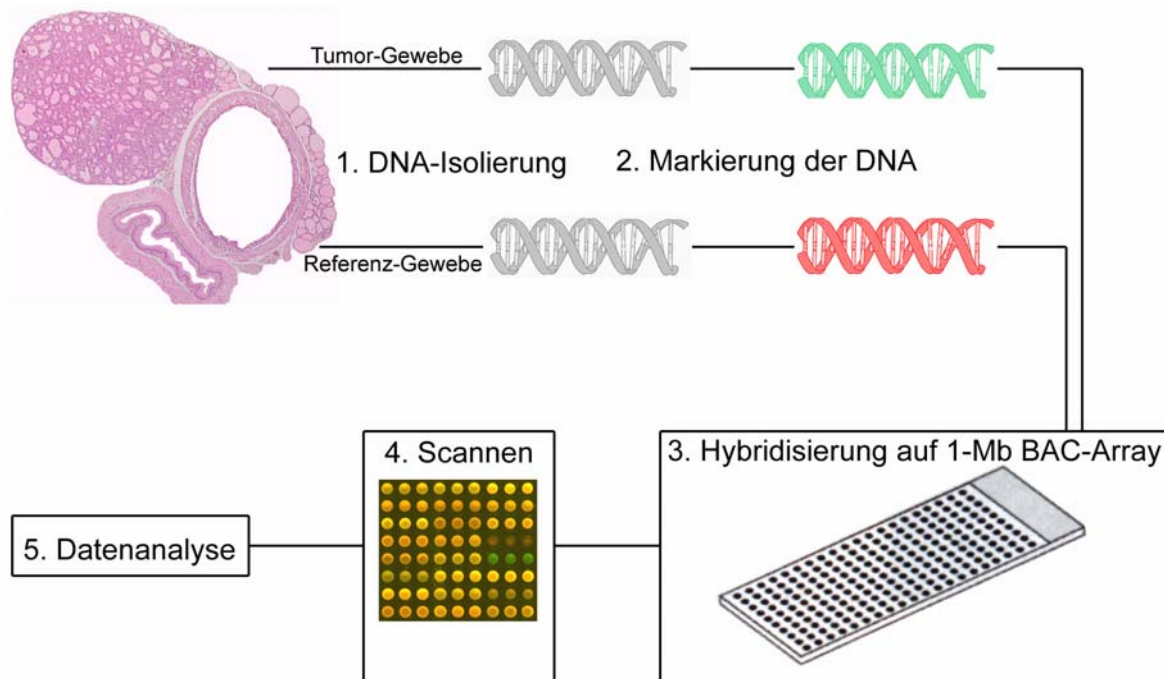


Abb. III.3. Vereinfachtes Schema des BAC Array-CGH Experiments: Im ersten Schritt wird die DNA aus mikrodiseziertem Proben- und Referenz-Gewebe isoliert (Abschnitte 3.2.2. und 3.2.3.). Anschließend folgt die Markierung der DNA mit unterschiedlich fluoreszierenden Cyanin-Farbstoffen (Cy3 und Cy5) mittels *Random-Primer Labeling* (Abschnitt 6.3.), sowie deren gemeinsame Hybridisierung auf ein 1-Mb-BAC-Array mit den in Triplikaten gespotteten BAC-Klonen (Abschnitt 6.4.). Mittels Scannen (Abschnitt 6.5.1.) lässt sich für jede auf dem Array vorhandene Gensonde ermitteln, in welchem Verhältnis die entsprechende DNA-Sequenz in Proben- und Referenz-Gewebe vorhanden ist: Gelbe Signale entsprechen gleich hoher Intensität in beiden Farbkanälen. Rote Signale lassen auf einen Verlust, grüne Signale auf eine Amplifizierung im Probenzell-Genom schließen.

#### **6.1. Herstellung der BAC-Microarrays**

Die verwendeten Mikroarrays (M1Mbv2NFP.gal) wurden im CNIO (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid) routinemäßig hergestellt und der vorliegenden Studie zur Verfügung gestellt. Es handelte sich hierbei um insgesamt 3264 jeweils dreifach auf Objektträger punktförmig aufgetragene BAC-Klone als Träger für definierte Genomabschnitte der Maus, sowie 193 Triplikate von negativen Kontroll-BACs, bestehend aus humaner bzw. Drosophila-DNA oder leeren Kontroll-*Spots*.

Die verwendeten BAC-Klone entstammten der Arbeit von Chung *et al.* (2004), wobei die BACs auf Basis der RPCI-23 *Mouse genomic* Datenbank (Osoegawa *et al.*, 2000) ausgewählt wurden. Der Abstand zwischen den Mittelpunkten aufeinander folgender BACs betrug hierbei durchschnittlich 0,89 Mb (Megabasen) und in 93,1 % weniger als 1,5 Mb. Die Amplifizierung der genomischen DNA aus den BAC-Klonen erfolgte mittels speziell hergestellten DOP- (*degenerate oligonucleotid*-) PCR-Primern, wodurch der Anteil unerwünschter *E. coli* DNA minimiert werden konnte. Die zuvor mit Amin assoziierten PCR-Produkte wurden in Triplikaten auf Amin-bindende Objektträger (Amersham) unter Verwendung eines MicroGrid II Arrays (BioRobotics) punktförmig aufgetragen („gespottet“). Das anschließende Prozedere erfolgte analog zu einem bereits veröffentlichten Protokoll (<http://www.sanger.ac.uk/Projects/Microarray/arraylab/protocol4>).

#### **6.2. Vorbereitung der Proben für die Array-CGH**

##### **6.2.1. Qualitätsüberprüfung der durch Mikrodissektion gewonnenen Proben- und Referenz-DNA (Schilddrüse und umgebendes Gewebe)**

Vor Durchführung der Hybridisierung wurden die aufgereinigten genomischen Schilddrüsen- und Referenz-DNA-Proben mittels Agarosegelelektrophorese (0,7%iges Agarosegel) qualitativ - d. h. die Fragmentierung betreffend - beurteilt. Ein erkennbar großer Anteil der fragmentierten DNA im Fragmentlängenbereich von über 300 bp wurde hierbei als ausreichend angesehen (Johnson *et al.*, 2006). Zudem wurde eine Quantifizierung über Spektrophotometrie (Nanodrop) durchgeführt. Die DNA-Proben wurden zu Transportzwecken stets auf Trockeneis verbracht und bis zur Weiterverarbeitung durchgehend bei -20 °C gelagert.

#### 6.2.2. Aufreinigung der aus Schwanzspitzengewebe gewonnenen Referenz-DNA

Die aus den Schwanzspitzen extrahierte DNA (8 µg in 42 µl) wurde bei 37 °C zusammen mit den Restriktionsenzymen *AluI* und *RsaI* (1,25 µl je Probe = 12,5 U, Fermentas) und dem Puffer Y<sup>+</sup>/Tango (5 µl je Probe, Fermentas) für 2 bis 3 Stunden inkubiert. Anschließend folgte die Aufreinigung der fragmentierten DNA mittels QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen GmbH, Hilden) nach Angaben des Herstellers.

#### 6.3. **Markieren der genomischen Proben- und Referenz-DNA mittels *Random Primer Labeling***

Zum Zwecke der Markierung war es erforderlich, sowohl ca. 1 µg Proben- als auch ca. 1 µg Referenz-DNA unter Zugabe von doppelt destilliertem Wasser (Aqua bidest.) auf ein Volumen von 22 µl einzustellen ( $1000 \text{ ng DNA} / \text{Konzentration [ng/µl]} = \text{Probenvolumen [µl]} \text{ ad } 22 \text{ µl}$ ).

Die jeweilige Markierung der Proben- und Referenz-DNA mit den fluoreszierenden Farbstoffen erfolgte mit Hilfe des BioPrime Array CGH-Kits für DNA-Markierung (SYS 30RXNS, Invitrogen), indem modifizierte Nukleotide (Cyanin-UTPs) unter Verwendung von DNA-Polymerase in die DNA inkorporiert wurden. Hierbei wurde stets die Schilddrüsen-DNA mit Carbocyanin 3 (Cy3, Indocarbocyanin) und die Referenz-DNA mit Carbocyanin 5 (Cy5, Indodicarbocyanin) markiert.

Im ersten Schritt bewirkte eine Inkubation in 20 µl *Random Primer Solution* bei 95 °C im Thermocycler für 5 Minuten die Denaturierung der DNA. Unmittelbar anschließend wurden die Proben für mindestens 5 Minuten auf Eis verbracht. Die Markierung der denaturierten DNA erfolgte unter Zugabe von 5 µl 10 x dUTP (Desoxy-Uridin-Triphosphat) Nukleotid-Mix, 1 µl Exo-Klenow-Enzym und 2 µl Fluoreszenzfarbstoff Cy3 bzw. Cy5 (1 mM) durch anschließende Inkubation der Proben bei 37 °C für 3 Stunden.

Sephadex G-50 Säulen (Amersham) wurden mit 50 µl der gefärbten Proben beladen und zentrifugiert (2 Minuten bei 735 g). Das hierbei gewonnene gereinigte Eluat von Cy3-Proben- und Cy5-Referenz-DNA jeweils derselben Maus wurde anschließend durch Vermischen kopräzipitiert. Die darauf folgende Messung der Absorption der Proben mittels Spektrophotometer diente der Verlaufskontrolle. In graphischer Darstellung waren *Peaks* bei 260 nm (cDNA), 550 nm (Cy3) und 650 nm (Cy5) als Nachweis der Cyanin-Farbstoffinkorporation festzustellen.

Mittels Microcon YM30-Säulen (Amicon) wurde die markierte DNA von der Flüssigkeit separiert und in 55 µl der zuvor vorbereiteten Hybridisierungslösung (Cot-1 DNA-tRNA-Gemisch) aufgenommen. Die für die Hybridisierung fertig vorbereiteten Proben waren bis zur Hybridisierung bei Raumtemperatur im Dunkeln aufzubewahren, um Fluorochromverluste zu vermeiden.

#### **6.4. Hybridisierung**

##### 6.4.1. Vorbereitung der Microarrays: Spülen, Blocken und Prähybridisierung

Die schrittweise Vorbereitung der *Microarrays* beinhaltete Spülen in einer Spüllösung für 5 Minuten, Denaturieren in kochendem Aqua bidest. für 1 Minute 30 Sekunden, und Waschen in selbigem bei Raumtemperatur für 1 Minute, wobei die Arrays in den Flüssigkeiten permanent unter Bewegung gehalten und in lichtundurchlässigen Behältern geschützt wurden. Nach Verbringen der BAC-Arrays in die vorgewärmte Prähybridisierungslösung und Inkubation bei 45 °C für eine Stunde wurde durch anschließendes Waschen in Aqua bidest. (5 Minuten) die Prähybridisierungslösung wieder entfernt. Durch Trocknen mittels Zentrifugation (800 g für 3 Minuten) in mit Papier ausgestopften Polypropylenröhrchen waren die Arrays für die Hybridisierung vorbereitet.

##### 6.4.2. Hybridisierung der Proben auf die Microarray-Objektträger

Die mit Fluoreszenzfarbstoff markierten DNA-Sonden wurden bei 72 °C für eine Minute denaturiert und anschließend bei 42 °C im Thermomixer belassen. Die Proben wurden auf spezielle Deckgläschen (Cubre LifterSlip de 25x40, Implem) pipettiert, und mitsamt diesen auf die BAC-Arrays gelegt, um eine gleichmäßigen Diffusion der Proben-Flüssigkeit zu gewährleisten. Die probenbeladenen BAC-Arrays wurden daraufhin in die mit Feuchtkammer-Lösung angefeuchteten, lichtdichten Hybridisierungskammern (Fisher Bioblock Scientific) verbracht. Die Hybridisierung erfolgte im Ofen bei 37 °C für 48 Stunden.

##### 6.4.3. Waschschritte nach der Hybridisierung

Nach Entfernen der Deckgläschen wurden die hybridisierten Arrays in lichtundurchlässigen Polyacetal-Boxen auf einem Kreisschüttler mit den Waschlösungen 1 (25 Minuten), 2 und 3

(je 5 Minuten), welche SSC und SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) in absteigender Konzentration enthielten, Aqua bidest. (1 Minute) und Azetonitril (10 Sekunden) gewaschen. Mit Ausnahme von Waschlösung 1, welche auf 60 °C erwärmt wurde, erfolgten die Waschschrirte bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Arrays mittels Zentrifugation (800 g für drei Minuten) in Polypropylenröhrchen getrocknet.

## **6.5. Array-CGH-Datenanalyse**

### 6.5.1. Aufbereitung der Array-CGH-Daten und Normalisierung

Unmittelbar nach Ablauf der Hybridisierung wurden die Arrays mittels des Agilent Array Scanners bei 532 nm und 635 nm (den Emissionsmaxima der verwendeten Fluorophore Cy3 und Cy5) gescannt, d. h. die Intensitätsverteilung mit Hilfe von Photodetektoren gemessen. Das resultierende Bild der beiden kombinierten Farbkanäle wurde unter Verwendung der Software GenePix Pro 5.0 (Axon Instruments, Burlingame, USA) quantifiziert. Die Aufbereitung der Rohdaten (*Preprocessing*) beinhaltete die felderweise lineare Normalisierung der Ursprungsdaten auf die mediane Cy3/Cy5-Ratio, um lokale Hintergrund-Fluoreszenz rechnerisch zu subtrahieren. Gleichzeitig erfolgte eine Transformierung der Werte im Sinne einer Varianzstabilisierung, da die untransformierten Werte im niedrigen Intensitätsbereich wesentlich größere Streuung aufweisen als im hohen Bereich (*Rosetta Error Model*). Nach Bildung der Mittelwerte aus den 3-fach gespotteten BACs (Triplikaten) wurden alle daraus resultierenden Cy3/Cy5-Intensität-Verhältniswerte (Proben-/Referenz-DNA) zum Zwecke der gleichgestellten Gewichtung von Zugewinnen und Verlusten in binär logarithmische Zahlen ( $\log_2$ -Ratio) konvertiert.

Ziel der gemeinsamen Normalisierung aller Arrays mittels des Programms DNMAAD (*Diagnosis and Normalization of spotted cDNA MicroArray Data*) war es, insbesondere die technisch bedingte und systematische Variabilität anzugleichen, welche auf Unterschiede bei Proben-Präparation, Färbe-Effizienz, Hybridisierung, Photodetektion (Scanner-Einstellungen), sowie Autofluoreszenz (SSC, SDS) zurückzuführen ist. Die Methode beinhaltet eine robuste lokale Regression pro Array (Vaquerizas *et al.*, 2004).



#### 6.5.2. Auswertung der Array-CGH-Daten

Die Analyse mittels Microsoft Excel erfolgte anhand von Punkt- und Linien-Diagrammen, wobei die  $\log_2$ -transformierten normalisierten Cy3/Cy5-Intensitäts-Ratios gegen die Klon-Position aufgetragen wurden. Die Datenmenge umfasste die  $\log_2$ -Ratios für insgesamt 2696 BAC-Klone in 27 Proben.

In Anpassung an das Ausmaß der Streuung wurden die Schwellenwerte (SW) für die Identifizierung von Amplifizierungen oder Deletionen derart definiert, dass der Betrag der  $\log_2$ -Ratio das Zweifache der Standardabweichung  $\sigma$  des entsprechenden Falles überschreiten muss (d. h.  $|\log_2\text{-Ratio}| > 2 \sigma$ ) (Sweet-Cordero *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2006). Um zufällige (streuungsbedingte) oder experimentelle Artefakte zu unterscheiden, wurden ausschließlich gleichgerichtete Veränderungen von mindestens zwei konsekutiven Klonen berücksichtigt.

Aneuploidien wurden modifiziert nach Hackett *et al.* (2003) entsprechend der folgenden Kriterien beurteilt: Ein Chromosom galt als verloren bzw. amplifiziert, wenn der aus den  $\log_2$ -Ratios gebildete Median des entsprechenden Chromosoms von Null um ein 2-faches der Standardabweichung der Mediane aller unveränderter Chromosomen des entsprechenden Falles abwich, und zugleich mindestens 80 % der BAC-Klone eine  $\log_2$ -Ratio im negativen (bei Verlust) bzw. positiven (bei Zugewinn) Bereich aufwiesen. Bei einer partiellen Chromosomendeletion / -amplifikation waren die Kriterien für einen Abschnitt des Chromosoms erfüllt.

Für jede der histologischen Untersuchungsgruppen (opB, SH, NH, FA, FK) wurden in mehr als einer Probe vorliegende Bereiche mit chromosomalen Alterationen verglichen und die gemeinsam überlappende Region (MCR, *minimal common region*) ermittelt. Aufgrund der Heterogenität von Schilddrüsentumoren sind gleichartige Veränderungen (Deletionen oder Amplifizierungen) im CGH-Profil von mindestens 20 % der Tumoren von signifikanter Bedeutung (van Dekken *et al.*, 2004) und gelten als Hinweis darauf, dass sich unter den dort lokalisierten Genen solche befinden, welche als sog. Kandidatengene an der Karzinogenese (entweder über Überexpression eines Onkogens, Fehlen eines Tumorsuppressorgens oder verändertem Expressionslevel über Gen-Dosierungs-Effekt) beteiligt sind. Als Kandidaten sind solche Gene zu betrachten, deren karzinogenetische Wirkung (in der Schilddrüse) beschrieben ist, aber auch solche Gene, die in der Schilddrüse exprimiert und die von funktioneller Bedeutung sind.

#### **7. Statistische Auswertung**

Die statistischen Auswertungen der Ergebnisse wurden mit Hilfe des Programms S-Plus 6.1 unter Anwendung des Fishers Exakt-Tests (Zweiseitige Berechnung) durchgeführt. Signifikante Unterschiede lagen vor, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit für einen Fehler erster Art unter 5 % (Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ) lag (Kreienbrock und Schach, 2000). Bei multiplen Tests (Anzahl  $m$ ) in der gleichen Grundgesamtheit wurde aufgrund der Alpha-Fehler-Kumulierung (d. h. eine auf falsch-positiven Ergebnissen beruhende erhöhte Wahrscheinlichkeit, die Nullhypothese fälschlicherweise zu verwerfen) für jeden Einzeltest eine Bonferroni-Korrektur durchgeführt ( $p' = p/m$ ), welche besagt, dass das Signifikanzniveau  $p'$  multipliziert mit der Anzahl der Tests kleiner Alpha ( $\alpha = 0,05$ ) sein muss.

## **IV. ERGEBNISSE**

### **1. Ergebnisse der histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen**

#### **1.1. Die histologische Klassifizierung der Schilddrüsenläsionen**

Die histologische Klassifizierung erfolgte anhand von insgesamt 365 untersuchten Mäusen, wovon 203 Mäuse der Radiojod- [ $I^{131}$ ] behandelten „J131-Gruppe“ und 162 der Gruppe der unbehandelten Kontrolltiere [I] angehörten. Die Auflistung aller pathologischen Befunde der einzelnen Fälle sind dem Anhang (Tabellen VIII.5. bis 10.) zu entnehmen; die Fallnummern der Mäuse mit gesunden Schilddrüsen (opB) sind nicht aufgelistet.

##### **1.1.1. Gesunde Schilddrüse der Maus und altersbedingte Veränderungen**

Im Rahmen der Diagnostik von Schilddrüsenveränderungen der Maus war zu beobachten, dass gesunde Schilddrüsenfollikel bereits eine erhebliche individuelle Variabilität betreffend ihrer Form, minimaler, maximaler und durchschnittlicher Größe und deren Verteilungsmuster innerhalb der Schilddrüse sowie hinsichtlich der Höhe des Follikelepithels aufwiesen. Diese Variabilität zeigte weitestgehend Mauslinien-spezifische und altersabhängige Konstanz. Während die Schilddrüsen der BHF1- und JHF1-Mäuse überwiegend großfollikuläre Morphologie aufwiesen und bei J6F1-Hybriden Follikel kleineren Durchmessers dominierten, zeichneten sich die Schilddrüsen der H6F1- und F2-Mäuse durch variable Follikelgröße aus (Abb. IV.1.).

In 17 Fällen (13/203 [6 %] I131-Mäuse und 4/162 [2 %] Kontrolltiere) wurden thyreoidale **Zysten** diagnostiziert (Anhang Tabellen VIII.5., 6. und 9.), wobei keine Korrelation zu Radiojod-Gabe mittels Fishers Exakt-Test ermittelt werden konnte ( $p\text{-Wert} = 0,13 > 0,05$ ). Hierbei handelte es sich teilweise um erkennbare Reste des embryonalen Ultimobranchialkörpers (UBB) mit zilientragenden Epithelzellen. Altersbedingte degenerative Veränderungen zeigten sich in Form von Verschmelzungen benachbarter Follikel mit flachem Epithel und Kolloid-Depletion (Abb. IV.1.G.).

#### IV. ERGEBNISSE

##### 1.1.2. Simple Hyperplasie (SH)

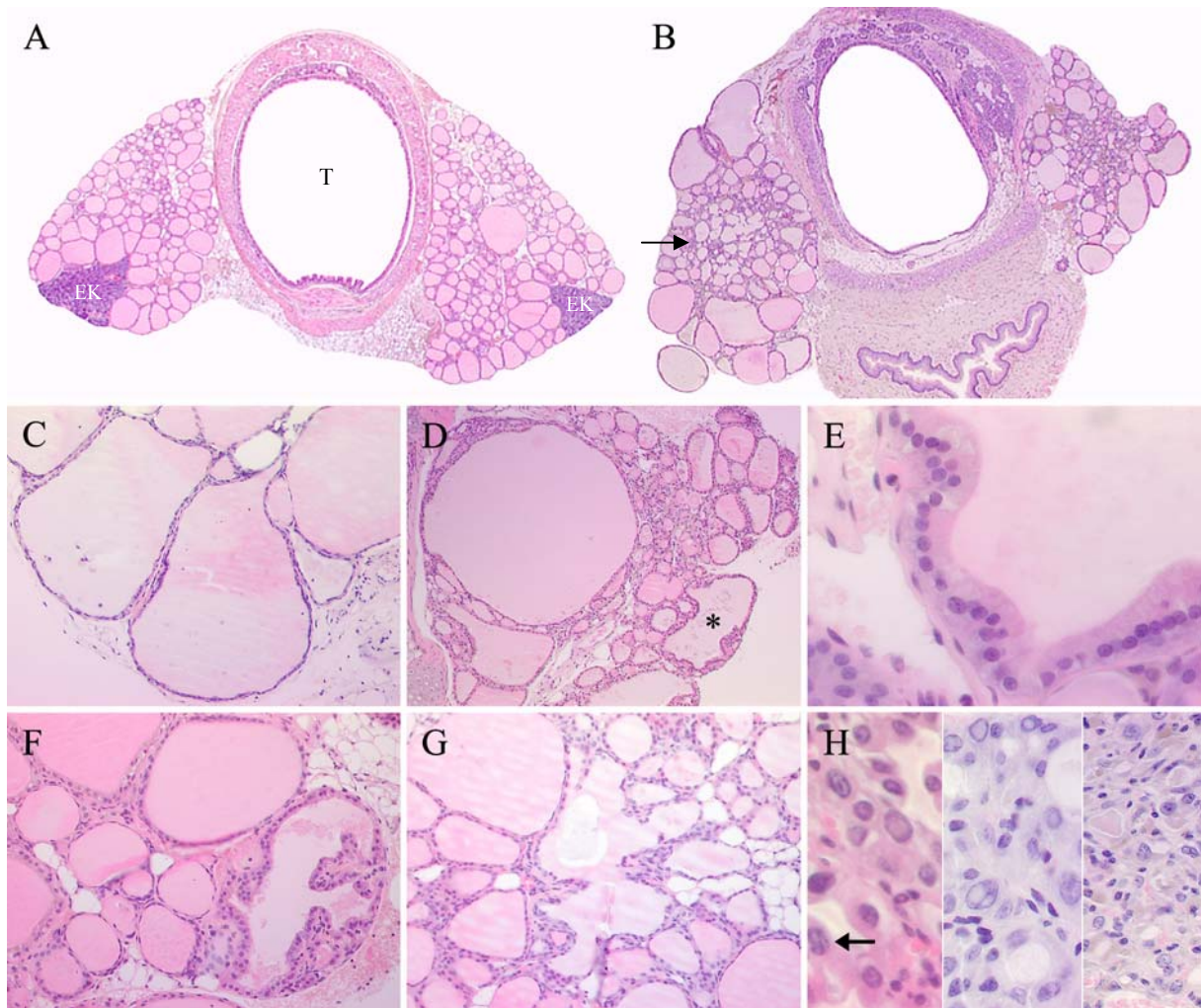
Von den insgesamt 365 Mäusen zeigten 52 Tiere Schilddrüsenveränderungen im Sinne einer simplen Hyperplasie (SH, Abb. IV.1.). Bereits simple Hyperplasien wurden in statistisch signifikant erhöhter Anzahl in der Gruppe der Radiojod-behandelten Mäuse (I131-Gruppe) diagnostiziert: 48 von 203 (24 %) versus vier von 162 (2 %) nicht Radiojod-behandelte Mäuse ( $p = 8,4 \times 10^{-10}$ ), wobei bei keinem der Kontrolltiere pseudopapilläre Protrusionen ausgeprägt waren. Zusätzlich trat SH begleitend bei drei der 16 (19 %) FA und bei vier der zwölf (33 %) FK auf.

Simple Hyperplasien waren durch diffuse (gleichmäßige) Verteilung zumeist makrofollikulärer Veränderungen der Schilddrüse bei gleichzeitigem Fehlen knotiger Herde charakterisiert. Unter Erhalt der typischen Organform konnte die gesamte Schilddrüse in ihrem Umfang vergrößert erscheinen (Struma, Kropf). Das Follikelepithel war typischerweise einreihig, flach bis hochprismatisch (hypertroph) mit basalständigen Zellkernen und bildete z. T. pseudopapilläre Einstülpungen ins Lumen aus (Struma mit Pseudopapillen). Eine weitere morphologische Subklassifizierung der SH in kolloide und parenchymatöse Struma ließ sich anhand von Follikelepithelhöhe und Umfang der Kolloidspeicherung vornehmen (Tab. IV.1.). Ausschließlich kolloide Struma mit flachepithelialen, unregelmäßig vergrößerten Follikeln (Abb. IV.1.C.) wurden in nur acht Fällen diagnostiziert. Bei den restlichen 44 Mäusen mit simpler Hyperplasie handelte es sich um parenchymatöse Struma (Abb. IV.1.B., D., E.) mit oder ohne beginnend pseudopapillären Einstülpungen oder um multifokale pseudopapilläre Hyperplasie ohne dilatierte Follikelformationen (Abb. IV.1.F.).

**Tab. IV.1.** Morphologie der diagnostizierten SH bei den Radiojod-behandelten und Kontroll- Mäusen:

	I131-Mäuse (n = 203)	Kontrollmäuse (n = 162)	Insgesamt (n = 365)
kolloide Struma	5 (10 %)	3 (75 %)	8
parenchymatöse Struma	24 (50 %)	1 (25 %)	25
Struma mit beginnenden Pseudopapillen	13 (27 %)	-	13
multifokale pseudopapilläre Hyperplasie	6 (13 %)	-	6
SH insgesamt	48	4	52

#### IV. ERGEBNISSE



**Abb. IV.1.** **A.** Die **gesunde Schilddrüse** einer H6F1-Maus zeichnet sich durch variable Follikelgröße aus. In der Bildmitte ist die Trachea (T) erkennbar und die Epithelkörperchen (EK) sind beidseits abgebildet (H6F1 Nr. 692 [I<sup>131</sup>], 25x HE). **B.** Im Vergleich hierzu stellt sich die **simple Hyperplasie** mit vergrößerten und unregelmäßig geformten Follikeln dar. Gleichzeitig sind zentral atrophisch veränderte Areale (Pfeil) erkennbar (H6F1 Nr. 862 [I<sup>131</sup>], 25x HE). **C.** Die **kolloide Hyperplasie** zeigt unregelmäßig dilatierte Follikel mit abgeflachtem hyperzellulärem Epithel (JHF2 Nr. 1032 [I<sup>131</sup>], 160x HE). **D.** Im Zuge proliferativen Wachstums sind bei der **parenchymatösen Hyperplasie** neben zystischen und mikrofollikulären Formationen beginnende pseudopapilläre Einstülpungen (Stern) ins Lumen erkennbar (H6F1 Nr. 936 [I<sup>131</sup>], 100x HE). **E.** Das einreihige hochprismatische Epithel besitzt apikal reichlich eosinophiles bis vakuolisiertes Zytoplasma (Hypertrophie) und basalständige rund-ovale Zellkerne (J6F2 Nr. 244 [I<sup>131</sup>], 640x HE). **F.** Die **pseudopapilläre Hyperplasie** (H6F1 Nr. 871 [I<sup>131</sup>]) mit einschichtigem epitheliale Überzug unterscheidet sich von einer altersbedingten (**G.**) **degenerativen Follikelverschmelzung**, bei der Reste der rupturierten Follikelepithelien und Kolloid-Depletion mit schwacher Eosinophilie und Vakuolisierung erkennbar sind (H6F1 Nr. 1054 [I<sup>131</sup>], 200x HE). **H.** Zu den Erscheinungen im Rahmen hyperplastisch veränderter Schilddrüsen gehören Variabilität der Zellkerngröße (Pleomorphismus), vereinzelt nukleäre Aufhellungen, Pseudoinklusionen (mittleres Photo) und Kernkerben (Pfeil), sowie **degenerative Veränderungen** mit extra- und intrazellulärer Pigmentablagerung (Photo rechts; JHF2 Nr. 86 [I<sup>131</sup>], J6F2 Nr. 962 [I<sup>131</sup>], 640x HE und J6F1 Nr. 932 [I<sup>131</sup>] 400x HE).

#### IV. ERGEBNISSE

##### 1.1.3. Komplexe (noduläre) Hyperplasie (NH)

Noduläre Hyperplasien (NH) lagen bei 45 der 365 untersuchten Mäuse vor (Abb. IV.2., IV.3.E. und IV.4.C.). Die Ausbildung einer NH war lediglich bei vier von 162 (2 %) unbehandelten Mäusen, jedoch bei 41 von 203 (20 %) Radiojod-exponierten Mäusen zu beobachten ( $p = 0,00000008$ , Tab. IV.2.). Zusätzlich traten hyperplastische Knoten in Begleitung mit fünf der 16 (31 %) diagnostizierten FA und fünf der zwölf (42 %) FK auf.

Eine NH war durch in der Regel multiples Auftreten nodulärer Formationen von variabler Größe gekennzeichnet und konnte isoliert oder gleichzeitig mit anderen Veränderungen vorkommen. Knoten einer nodulären Hyperplasie waren mehr oder weniger gut abgrenzbar und zeigten weder Kapselbildung noch Kompression des umgebenden Gewebes. Die unterschiedlichen Wachstumsmuster dienten der näheren Beschreibung der Knoten und sind in ihrer Häufigkeit der Tabelle IV.2. zu entnehmen. Die Knoten wiesen pseudopapilläres, mit im Gegensatz zur SH fortgeschrittener komplexerer Verzweigung der Pseudopapillen (Abb. IV.2.C. und D.), follikuläres (Abb. IV.2.E.) und / oder solides Wachstum auf (Abb. IV.2.F.).

**Tab. IV.2.** Nähere Beschreibung (Wachstumsmuster) der Noduli bei den diagnostizierten NH:

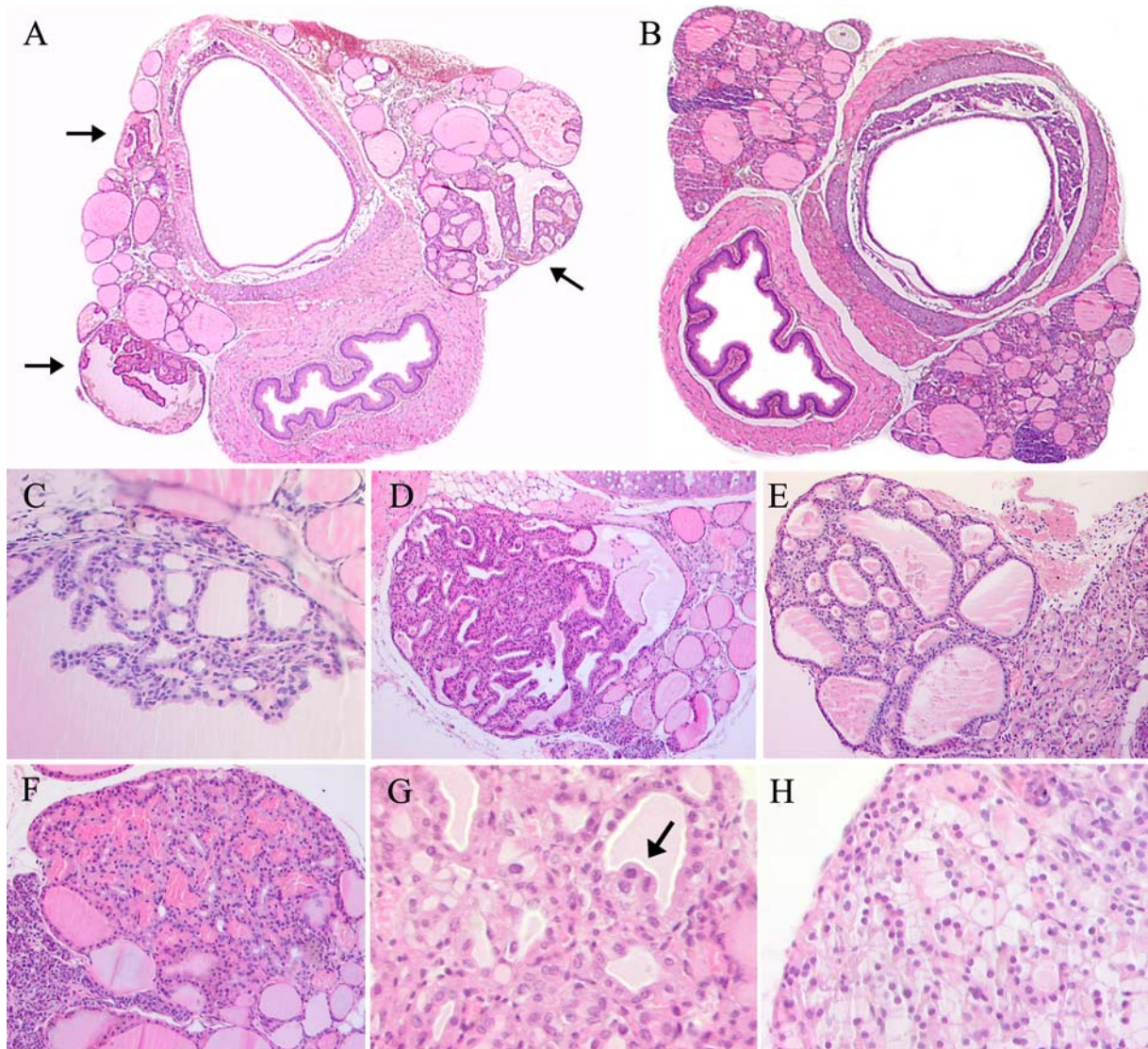
	I131-Mäuse (n = 203)	Kontrollmäuse (n = 162)	Insgesamt (n = 365)
follikulär	14 (34 %)	2 (50 %)	16 (36 %)
pseudopapillär	5 (12 %)	-	5 (11 %)
solide	8 (20 %)	1 (25 %)	9 (20 %)
gemischt	14 (34 %)	1 (25 %)	15 (33 %)
NH insgesamt	41	4	45

Des Weiteren konnten hyperplastische Knoten durch ein erhebliches Maß zytologischer und nukleärer Atypien auffallen, zeigten jedoch keine Zunahme mitotischer Aktivität. Zytoplasmatische Aufhellungen traten in hyperplastischen Knoten ebenso auf, wie in gut- und bösartigen Neoplasien (Abb. IV.2.H., IV.3.I.).

Bei den komplexen Hyperplasien handelte es sich häufig um Veränderungen, welche Neoplasien bereits sehr nahe standen, insbesondere wenn bei zumeist solidem Wachstum eine partielle Kapselbildung zu beobachten war (Abb. IV.3.E.). So waren in allen Fällen mit NH die Differentialdiagnosen eines Adenoms in nodulärer Hyperplasie oder vorliegender multipler FA zu berücksichtigen.



#### IV. ERGEBNISSE



**Abb. IV.2. Noduläre Hyperplasien (NH):** **A.** Die NH zeigt die typische Morphologie mit multipel auftretenden nicht abgekapselten Knoten (Pfeile), wobei pseudopapilläre und mikrofollikuläre Wuchsformen gleichzeitig vorhanden sind (H6F1 Nr. 873 [ $I^{131}$ ], 25x HE). **B.** Die komplexe Hyperplasie dieser Maus zeichnet sich durch diffuse Verteilung solider Areale mit schlechter Abgrenzbarkeit aus (J6F2 Nr. 1548 [ $I^{131}$ ], 31,25x HE). **C.** Das einschichtige kubische Epithel der **pseudopapillären Hyperplasie** weist komplex verzweigende Einstülpungen ins Follikellumen ohne fibrovaskulären Grundstock auf (H6F1 Nr. 917 [ $I^{131}$ ], 200x HE). Zu beachten ist die milde Kompression des umgebenden Parenchyms (ohne Druckatrophie), verursacht durch den - in diesem Fall - zystisch dilatierten Follikel. **D.** Fortgeschrittenes Wachstum führt bei nahezu kompletter Füllung des Follikellumens zu Entstehung pseudopapillärer Noduli (H6F1 Nr. 655 [ $I^{131}$ ], 100x HE). **E.** Das dem follikulären Knoten angrenzende Parenchym weist degenerative Veränderungen auf (JHF2 Nr. 03/1927 [ $I^{131}$ ], 125x HE). **F.** Der **solide** Knoten zeigt deutliche Hyperämie und schlechte Demarkation (H6F1 Nr. 655 [ $I^{131}$ ], 160x HE). **G.** Der vergrößerte Ausschnitt eines Knotens demonstriert neben variabler Zytologie (Zell[kern]größe und -form, Chromatingehalt) auch erkennbare Epithelzell-Desquamation (Pfeil) und zytoplasmatische Aufhellungen (J6F2 Nr. 86 [ $I^{131}$ ], 320x HE). **H.** Zytoplasmatische Vakuolenbildung ist neben gleichförmigen kleinen Zellkernen in diesem hyperplastischen Knoten erkennbar ( JHF2 Nr. 811 [ $I^{131}$ ], 320x HE).

## IV. ERGEBNISSE

### 1.1.4. Follikuläres Schilddrüsenadenom (FA)

Es wurden insgesamt 16 von 365 Mäusen mit follikulärem Adenom (FA) diagnostiziert (Tab. IV.3.; Abb. IV.3. und IV.4.D.). Bei einem einzigen der Fälle handelte es sich um ein nicht strahlenexponiertes Tier (H6F1 Nr. 951, Abb. IV.3.A.) so dass der Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant ist ( $p = 0,0013$ ).

Das FA trat definitionsgemäß in der Regel solitär auf, war scharf demarkiert und von einer vollständigen (oft dünnen) Kapsel umgeben (Abb. IV.3.H.). Es verursachte Kompression des umgebenden Gewebes (Abb. IV.3.G.) und wies zytologische Uniformität bei fehlenden Zellatypien und kaum vorhandener mitotischer Aktivität auf (Abb. IV.3.C. bis E.). Die Architektur wich deutlich von der des umgebenden gesunden Schilddrüsengewebes ab, wobei (mikro-) follikuläres bis solides Wachstum vorherrschte (Tab. IV.3.).

Neun der 16 Tumoren (56 %) erfüllten als solitär vorliegendes FA alle humanpathologisch gängigen Kriterien für die Diagnosestellung (s. Abb. IV.3.A. bis C.). Fünf FA (31 %) waren von multiplen knotigen Formationen im Sinne einer NH begleitet, zeigten jedoch im Gegensatz zu den anderen Noduli Kapselbildung, Kompression und zytologische Gleichförmigkeit (Abb. IV.3.D.). Zwei Fälle (13 %) waren als multiple FA zu bezeichnen, da jeweils zwei Knoten die typischen Merkmale eines FAs aufwiesen (J6F2 Nr. 780, J6F1 Nr. 932).

**Atypische Adenome** (Abb. IV.3.F.) im Sinne der humanpathologischen Klassifizierung lagen in drei der strahlenassoziierten Fälle vor, da eine erhöhte Proliferationsrate und zelluläre Atypien ermittelt werden konnten. Derartige Merkmale waren hierbei mit überwiegend solidem Wachstum assoziiert und die Tumoren unterschieden sich vom Karzinom lediglich durch fehlende Anzeichen für invasives Verhalten (H6F1 Nr. 653; J6F1 Nr. 931 und 932).

Zusätzlich wurden in der Gruppe der I131-Mäuse zwei FA in Koexistenz mit einem Karzinom ermittelt (JHF1 Nr. 612 und J6F2 Nr. 798).

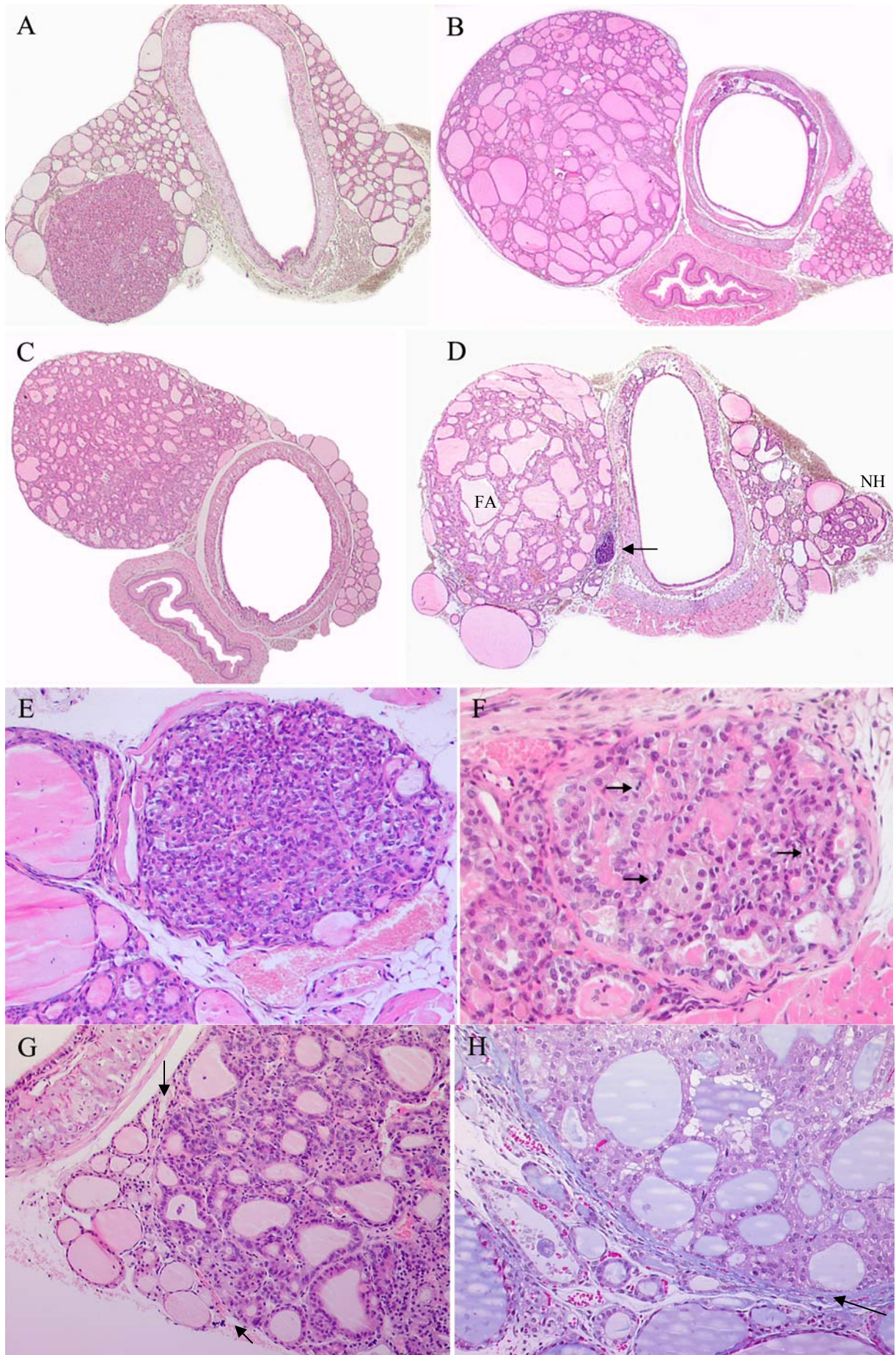
**Tab. IV.3.** Nähere Beschreibung (Wachstumsmuster) der diagnostizierten FA:

	I131-Mäuse	Kontrollmäuse	Insgesamt
normofollikulär	4 (27 %)	-	4
makrofollikulär	2 (13 %)	-	2
mikrofollikulär	4 (27 %)	-	4
solide*	5 (33 %)	1 (100 %)	6
FA insgesamt	15	1	16

\* bei solidem Wachstum waren stets gleichzeitig mikrofollikuläre Strukturen enthalten

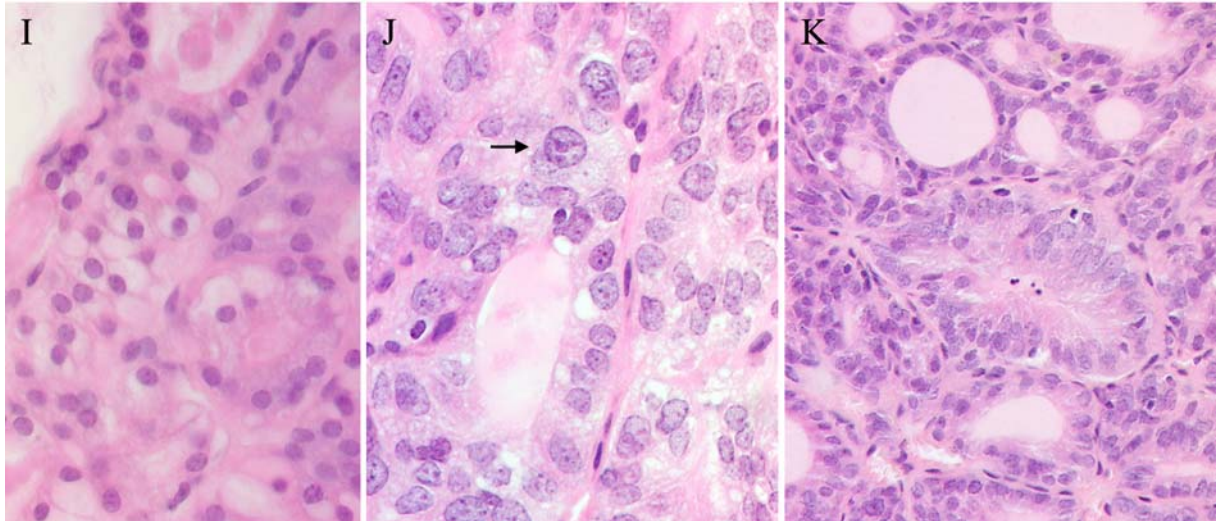


#### IV. ERGEBNISSE





#### IV. ERGEBNISSE



**Abb. IV.3. Follikuläre Schilddrüsenadenome (FA): A. bis C.** Die Photos stellen solitäre FA mit den unterschiedlichen vorkommenden Wachstumsmustern dar: Die **solide** (A.; H6F1 Nr. 951 [I<sup>131</sup>], 40x HE), die **makrofollikuläre** (B.; BHF1 Nr. 828, 20x HE, vergrößerter Ausschnitt J.) und die **mikrofollikuläre** (C.; H6F1 Nr. 653 [I<sup>131</sup>], 31,25x HE, vergrößerte Ausschnitte G. und K.) Variante. Erkennbar ist die gute Demarkation der Knoten, deren bindegewebige Komponente nur schwach ausgeprägt ist. **D.** Das makrofollikuläre FA (links) liegt in Koexistenz mit einer nodulären Hyperplasie vor (**FA in NH**; H6F1 Nr. 869 [I<sup>131</sup>], 25x HE, vergrößerter Ausschnitt H.). Gleichzeitig ist lymphozytäre Infiltration in der Tumor-Peripherie vorhanden (Pfeil).

**E.** Der kleine solide Knoten einer **nodulären Hyperplasie** ist durch eine unvollständige Kapselbildung charakterisiert (J6F2 Nr. 1887 [I<sup>131</sup>], 160x HE). **F.** Im Gegensatz hierzu zeigt das solide **atypische FA** – bei gleichfalls geringer Größe – die Ausbildung einer vollständigen, vergleichsweise dicken und unregelmäßigen Bindegewebskapsel, sowie eine deutlich hohe Mitoserate (Pfeile) in Verbindung mit Pleomorphismus (variable Zell-, Zellkerngröße; J6F1 Nr. 932 [I<sup>131</sup>], 250x HE).

**G.** Der dargestellte Randbereich eines FAs lässt die scharfe Demarkation (Pfeile), die vorhandene milde Kompression des umgebenden Schilddrüsengewebes und die deutlich abweichende Zytoarchitektur des Tumors erkennen (H6F1 Nr. 653 [I<sup>131</sup>], 125x HE). **H.** Bei Färbung mit Masson Trichrom ist die bindegewebige Demarkation des follikulären Tumors trotz geringer Dicke der Bindegewebskapsel in Form einer blau angefärbten „Linie“ (Pfeil) deutlich erkennbar (H6F1 Nr. 869 [I<sup>131</sup>], 200x).

**I.** Die Zellkerne eines FAs stellen sich typischerweise isomorph, klein und normo- bis hyperchrom dar. Zudem sind zytoplasmatische Aufhellungen erkennbar (J6F2 Nr. 798s [I<sup>131</sup>], 640x HE). **J.** Bei gleicher Vergrößerung ist das morphologische Spektrum der Adenomzellen erkennbar. Es handelt sich hier um deutlich vergrößerte, blasse Zellkerne von unregelmäßiger und ungleichmäßiger Gestalt, welche 2 bis 3 nicht randständige Nukleoli enthalten. Ein Zellkern (Pfeil) enthält eine eosinophile Pseudoinklusion (BHF1 Nr. 828 [I<sup>131</sup>], 640x HE). **K.** Die atypischen länglich-ovalen Zellen mit vergrößerten hellen Zellkernen in der Bildmitte bei diesem atypischen FA können als fokale Hyperplasie gedeutet werden (H6F1 Nr. 653 [I<sup>131</sup>], 320x HE).

##### 1.1.5. Follikuläres Schilddrüsenkarzinom (FK)

Bei elf der 203 Radiojod-behandelten Mäuse (5 %) und bei einer von 162 unbehandelten Kontrollmäusen (1 %) lagen Veränderungen vor, die entsprechend der formulierten Kriterien

#### IV. ERGEBNISSE

der Gruppe der Karzinome zuzuordnen waren (Abb. IV.4.). Da bei keiner Maus eine Metastasierung des Schilddrüsentumors nachweisbar war, beschränkte sich die Diagnosestellung eines malignen Tumors auf den Nachweis lokaler Invasivität in das umgebende Gewebe (Abb. IV.4.H. und I.) oder in die Blutgefäße (Abb. IV.4.G.), bzw. den Nachweis eines Ein- oder Durchbruchs in die den Tumor umgebende Bindegewebskapsel (Abb. IV.4.F.).

Die Karzinome zeigten neben überwiegend solidem Wachstum auch follikuläre oder papilläre Formationen, oft gemischt in demselben Tumor oder derselben Schilddrüse (s. Tab.IV.5. und Abb. IV.4.A.). In sechs Fällen lagen solitäre FK (50 %) vor, dreimal war bilaterales malignes Tumorstadium (25 %) zu beobachten und drei weitere Karzinome zeigten multizentrische Entstehung (25 %; Abb. IV.4.J. und K.). Während die papillären FK-Anteile zweier bilateraler FK (Nr. 665p, 802p) und vier solide bis follikuläre FK (Nr. 589, 793s, 798, 811) bei lokaler Infiltration in das umgebende Gewebe keine deutliche Kapsel aufwiesen, zeichneten sich sechs der solide bis follikulär wachsenden FK bei vorhandener, unregelmäßiger und ungleichmäßiger (teilweise nur partieller) Kapsel durch Kapseleinbruch / -durchbruch oder Gefäßeinbruch aus. Bei einem (Nr. 961) der drei Fälle mit multizentrischem FK (Nr. 590, 669) handelte es sich um das einzige Kontrolltier mit Karzinom.

Die FK zeigten zum Teil deutlichen Pleomorphismus und zelluläre Atypien. Andere wiederum wiesen überwiegend isomorphe Zytologie und daher große Ähnlichkeit zu einem gutartigen Tumor auf. Zu den hervorstechenden Merkmalen sämtlicher diagnostizierter FK gehörte eine deutlich erhöhte Mitoserate nebst vorhandenen atypischen Mitosefiguren (vgl. Abb. IV.4.B, E. und K.)

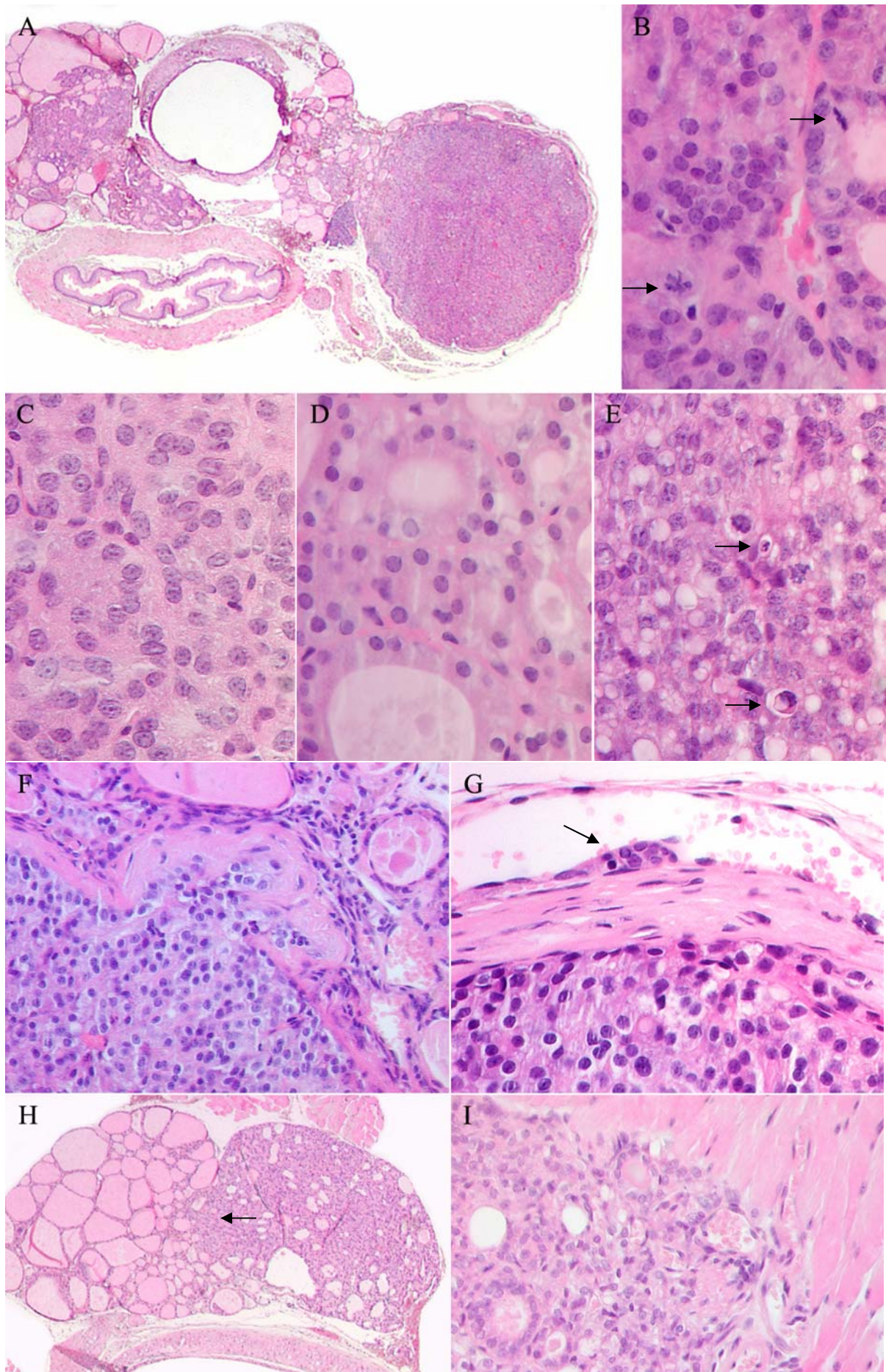
Mit einer Ausnahme (Fall 802) traten bei sämtlichen Schilddrüsen mit strahlenassoziiertem Karzinomen zusätzliche proliferative Veränderungen auf: Vier Fälle mit SH (33 %), fünf mit NH (42 %) und zwei mit FA (17 %).

**Tab. IV.4.** Nähere Beschreibung (Wachstumsmuster) der diagnostizierten Karzinome:

		I131-Mäuse	Kontrollmäuse	Insgesamt
FK	solide	4	-	4
	solide-mikrofollikulär	2	-	2
FK bilateral	solide und papillär	2	-	2
	solide und makrofollikulär-solide	1	-	1
multizentrisches FK	solide	1	-	1
	solide-mikrofollikulär	1	1	2
FK insgesamt		11	1	12

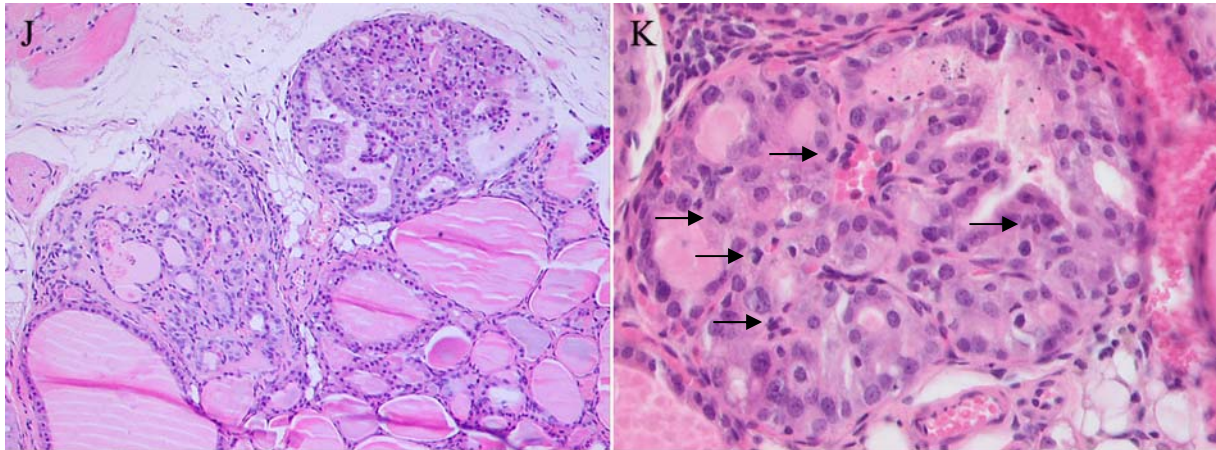


#### IV. ERGEBNISSE





#### IV. ERGEBNISSE



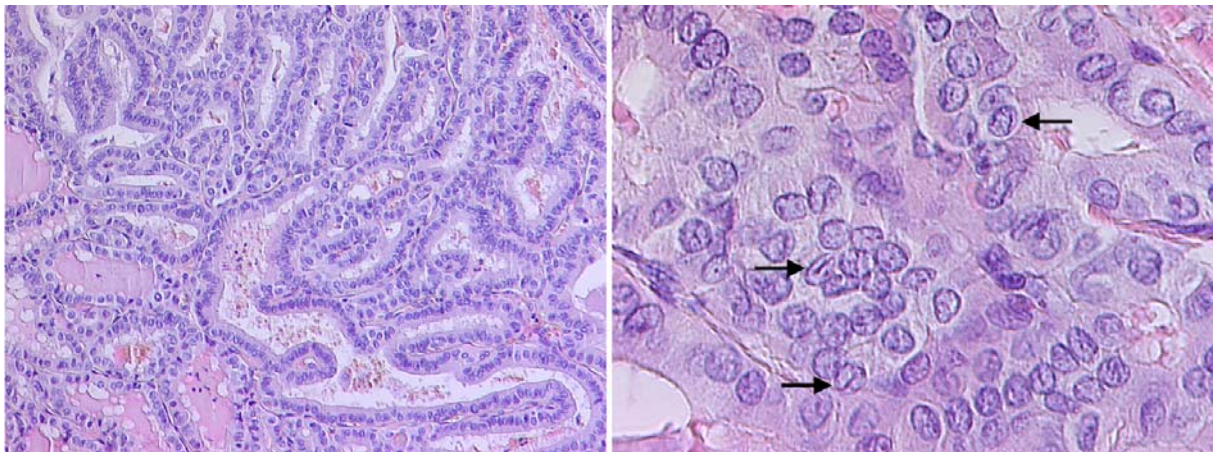
**Abb. IV.4. Follikuläre Karzinome (FK):** **A.** Das Photo stellt eine repräsentative Schilddrüse mit bilateralem Karzinom dar. Die **solide Variante** zeigt große morphologische Ähnlichkeit zum (atypischen) FA, im Sinne gut abgrenzbarer abgekapselter Knoten mit Kompression des umgebenden Gewebes, wobei die Kapsel hier von auffallend dicker und unregelmäßiger Gestalt ist. Demgegenüber steht eine vorherrschend **papilläre Variante des FKs** im anderen Lobus, welches sich durch lokal invasives Verhalten (zwischen Ösophagus und Trachea) auszeichnet (JHF2 Nr. 665 [I<sup>131</sup>], 20x HE). **B.** Ein vergrößerter Ausschnitt zeigt die in beiden Tumoren vorliegende vermehrte Anzahl mitotischer Figuren (Pfeile). Bei der unteren der beiden handelt es sich um eine atypische Mitosefigur (640x HE). **C. bis E.** Mit identischer Vergrößerung zeigen die Bilder vergleichend die unterschiedliche Zytologie der verschiedenen knotigen Veränderungen, welche bei einer Maus gleichzeitig vorhanden waren: **C.** Die **noduläre Hyperplasie** besteht aus zytoplasmareichen Zellen mit leicht vergrößerten hellen Zellkernen. **D.** Das **follikuläre Adenom** besticht durch zytologische Uniformität mit kleinen Zellkernen bei niedrigem Kern-Plasma-Verhältnis und geringer Zelldichte. **E.** Im Falle des follikulären **Karzinoms** sind neben erhöhter Mitoserate und zahlreichen apoptotischen Körperchen (Pfeile), auch Pleomorphismus und ein erhöhtes Kern-Plasma-Verhältnis bei vermehrter Zelldichte vorhanden. Zudem ist in diesem Fall das Zytoplasma der meisten Zellen deutlich vakuolisiert und zeigen Ähnlichkeit zur humanen *clear-cell* Variante eines FK (JHF1 Nr. 612 [I<sup>131</sup>], 640x HE).

**F.** Eindeutig invasives Potential äußert sich in klar erkennbarem Kapseleinbruch der Tumorzellen mit Wachstum in pilzförmiger Gestalt. Die Kapsel ist hierbei nicht unterbrochen (JHF2 Nr. 665 [I<sup>131</sup>], 320x HE). **G.** Der an der Gefäßwand anhaftende Verband von Tumorzellen (Pfeil) in einer großkalibrigen Vene, welche der Kapsel unmittelbar benachbart ist, ist beweisend für vaskuläre Invasion (JHF2 Nr. 665, 400x HE). Auf den weiteren beiden Bildern sind (**H.**) lokale Tumor-Infiltrationen (Pfeil) in das angrenzende Schilddrüsenparenchym (J6F2 Nr. 589 [I<sup>131</sup>], 40x HE) bzw. (**I.**) in die angrenzende Halsmuskulatur dargestellt (J6F2 Nr. 798 [I<sup>131</sup>], 320x HE).

**J. und K.** Hier sind **kleine multizentrische FK** dargestellt (JHF2 Nr. 669 [I<sup>131</sup>], 320x HE und J6F2 Nr. 590 [I<sup>131</sup>], 125x HE). **J.** Während der linke Tumor eine unvollständige, partielle verdickte Kapsel besitzt und invasives Verhalten nicht nur anhand der Multizentrität (intrathyroidale Disseminierung) sondern auch an in mehrere Richtungen infiltrativem Wachstum erkennbar ist, fehlt bei dem rechts liegenden Tumor eine bindegewebige Abkapselung vollständig. **K.** Die erhöhte Proliferationsrate des malignen Tumors ist anhand zahlreicher Mitosefiguren (Pfeile) ersichtlich. Zudem sind vergrößerte Zellkerne, zentrale Zellkernaufhellungen und Pleomorphismus feststellbar. Invasives Potential ist lokal nicht erkennbar, sondern geht aus der multizentrischen Verteilung (nicht dargestellt) hervor. Peritumoral sind lymphozytäre Infiltrate vorhanden (oberer Bildrand links).

##### 1.1.6. Papilläres Schilddrüsenkarzinom (PK)

Ein gegebenenfalls vorhandenes papilläres Karzinom (PK) war entsprechend der humanpathologischen Definition ausschließlich an Hand der PK-typischen Zellkernveränderungen (sog. Milchglaszellkerne, Pseudoinklusionen, verdickte Kernmembran, nukleäre longitudinale Kerben) in ausreichend großer Menge charakterisiert (s. Schrifttum; WHO, 2004). Sowohl bei Hyperplasien als auch bei Neoplasien, und insbesondere im Rahmen degenerativer Veränderungen konnten nukleäre Pseudoinklusionen (Abb. IV.1.H., 3.J.), vergrößerte blasse Zellkerne (Abb. IV.3.J. und K., 4.C.) und solche mit (undeutlichen) Einkerbungen vereinzelt nachgewiesen werden. Die einem humanen PK entsprechenden nukleären Charakteristika, welche in Abb. IV.5. dargestellt sind, waren jedoch in keinem Tumor in ausreichender Qualität und Quantität vorhanden, so dass es sich bei den diagnostizierten Karzinomen ausschließlich um FK handelte.



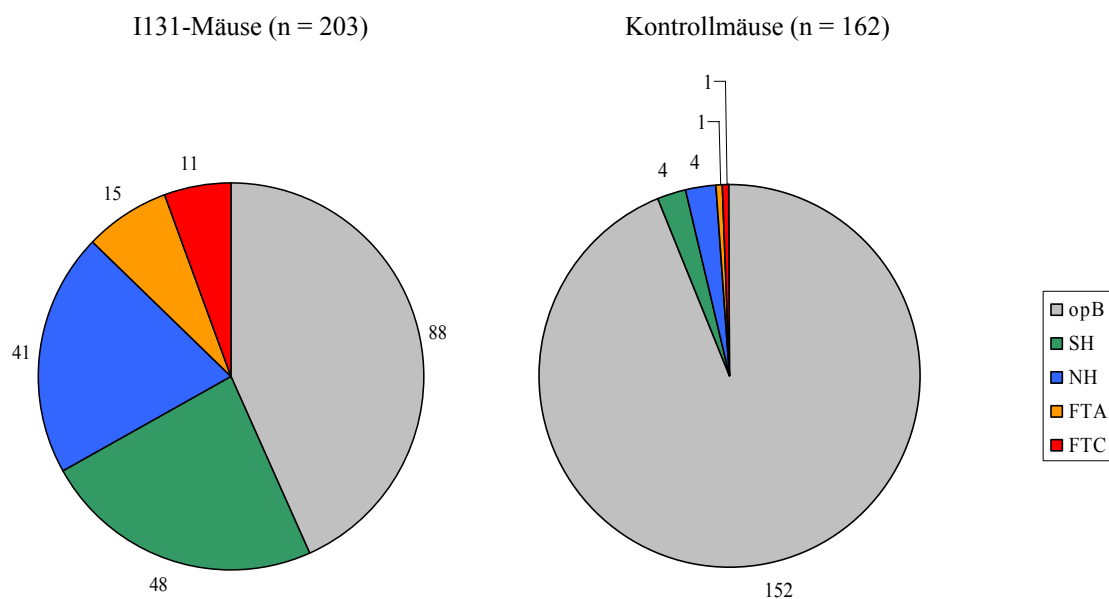
**Abb. IV.5.** Charakteristika eines humanen PK: Das typische PK (links) mit überlappenden Zellkernen zeigt bei stärkerer Vergrößerung (rechts) die typischen Milchglaszellkerne mit verdickter Kernmembran, zahlreichen nukleären Kerben (z. B. Pfeile) sowie einigen eosinophilen Pseudoinklusionen (200x und 320x HE).

## IV. ERGEBNISSE

### 1.2. Statistische Auswertung der histologischen Befunde

Die  $I^{131}$ -behandelten Mäuse (I131-Gruppe) zeigten im Vergleich zu den nicht Radiojod-behandelten Tieren (Kontrollgruppe) eine erhöhte Inzidenz hyperplastischer und neoplastischer Schilddrüsenerkrankungen (Abb. IV.6.), so dass auf Basis des modifizierten Signifikanzniveaus  $p' = 0,01$  signifikante Unterschiede für alle Läsionen (abnehmend von SH über NH bis FA) mit Ausnahme der Karzinome errechnet wurden (Fishers Exakt-Test, Tab. IV.6). Die fehlende statistische Signifikanz ist auf die geringe Anzahl an Tumoren zurückzuführen, eine Tendenz ist nichtsdestotrotz klar erkennbar (5,4 % gegenüber 0,6 %).

**Abb. IV.6.** Übersicht der Häufigkeit aller Diagnosen im Vergleich zwischen den Radiojod-behandelten Tieren (I131-Gruppe) und den unbehandelten Mäusen (Kontrollgruppe). Die angegebenen Werte stellen die Anzahl der betroffenen Mäuse dar (Absolutwerte):



**Tab. IV.6.** Tabellarische Übersicht der Inzidenz der Diagnosen mit Angabe von relativem Risiko (RR) und der p-Werte nach Fishers Exakt-Test (modifiziertes Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur:  $p' = 0,01$ ):

	I131-Mäuse (n = 203)	Kontrollmäuse (n = 162)	RR	p-Werte
gesunde Schilddrüse (opB)	88 (43,3 %)	152 (93,8 %)		$1,5 \times 10^{-26}$
simple Hyperplasie (SH)	48 (23,6 %)	4 (2,5 %)	9,4	$8,4 \times 10^{-10}$
noduläre Hyperplasie (NH)	41 (20,2 %)	4 (2,5 %)	8,1	$8,3 \times 10^{-8}$
Adenom (FA)	15 (7,4 %)	1 (0,6 %)	12,3	0,0013
Karzinom (FK)	11 (5,4 %)	1 (0,6 %)	9,0	0,015 (n. s.)

#### IV. ERGEBNISSE

Bei insgesamt 26 Tumoren der Radiojod-behandelten Mäuse (12,8 %) und zwei Tumoren in der Kontrollgruppe (1,2 %) lag das relative Risiko (RR) bei 10,7 (d. h. 11-fach erhöhtes Risiko bei Strahlenexposition). Die relative Risikodifferenz (RRD) als Maß für die prozentuale Risikoerhöhung betrug 9,4 und der Anteil auf Exposition zurückzuführender Tumoren 83,9 % (PAR, populationsattributables Risiko). Bereits das Risiko einer hyperplastischen Erkrankung erhöhte sich durch Radiojod-Gabe bei einem RR von 9,4 für SH bzw. 8,1 für NH (s. Tab. IV.6.).

##### 1.2.1. Korrelation der Befunde mit dem genetischen Hintergrund

In Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund der Mäuse (H6F1, BHF1, J6F1, JHF1, J6F2 und JHF2) waren tendenzielle Unterschiede bezüglich Inzidenz und Morphologie der verschiedenen Läsionen (SH, NH, FA und FK) auszumachen:

**Simple Hyperplasien** wurden mit Ausnahme der drei J6F1-Mäuse bei jeder der I131-behandelten Mausgruppen mit einem Anteil zwischen 6 und 42 % diagnostiziert (Tab. IV.7.a), wohingegen unter den Kontrolltieren lediglich vier (24 %) JHF2-Mäuse derartige Veränderungen zeigten (Tab. IV.7.b). Während parenchymatöse Struma mit oder ohne (pseudo-) papillären Projektionen gleichermaßen in allen Gruppen zu finden waren, beschränkte sich das Vorkommen kolloider Struma auf eine H6F1-Maus (Nr. 163) und sieben JHF2-Hybride. Ein signifikanter Unterschied bezüglich Inzidenz der SH bei Radiojod-behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe war nur bei der H6F1-Gruppe vorhanden (Fishers Exakt-Test:  $p < 0,0125$ , Tab. IV.8.).

Die Diagnose einer **nodulären Hyperplasie** war bei Mäusen mit H6F1-, J6F2- und JHF2-Hintergrund zu stellen, wohingegen die drei anderen F1-Maushybridgruppen auch bei Radiojod-Gabe keine Neigung zur isolierten Ausbildung von NH zeigten (BHF1, J6F1, JHF1; Tab. IV.7.b). Unter den unbehandelten Kontrolltieren waren hyperplastische Veränderungen ausschließlich bei F2-Hybriden vorzufinden (Tab. IV.7.a). Die Inzidenz von NH bei den Radiojod-behandelten J6F2-Mäusen (27 %) zeigte sich im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren (21 %) dieser Mauslinie nur unwesentlich erhöht, wobei in beiden Gruppen ebenso wie bei den anderen F2-Mäusen (JHF2) follikuläres oder solides Wachstum der Noduli dominierte. Auffallend war auch eine schlechtere Abgrenzbarkeit der Noduli bei den F2-Mäusen, insbesondere J6F2 (Abb. IV.2.B.). Die nodulär hyperplastischen Veränderungen der H6F1-Mäuse hingegen zeigten im Vergleich zu den F2-Tieren eine erhöhte Neigung zu papillärem Wachstum (5/18 [28 %] papillär, 12/18 [67 %] gemischt, 1/18 [6 %]



#### IV. ERGEBNISSE

mikrofollikulär). Zudem handelte es sich bei den H6F1-Tieren um die einzige Gruppe mit signifikant erhöhter Inzidenz der NH bei Radiojod-behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe (Fishers Exakt-Test:  $p < 0,0125$ ).

Bei vier der untersuchten Mausgruppen (BHF1, J6F1, JHF1, JHF2) wurde innerhalb der Kontrollgruppe kein **Tumor** diagnostiziert. Demzufolge lag ein PAR von 100 % vor, und der Anteil neoplastischer Veränderungen bei den Radiojod-behandelten Tieren betrug 9 % (JHF1, nicht signifikant [n. s.]) 12 % (BHF1, n. s.), 19 % (JHF2, n. s.) und 100 % (3 von 3 J6F1,  $p = 0,02 < 0,05$ ). Demgegenüber waren bei H6F1- und J6F2-Hybriden Tumoren auch ohne Radiojod-Behandlung entstanden und das RR betrug 8 (H6F1, n. s.) bzw. 2 (J6F2, n. s.) (Tab. IV.7.a und b). Ein mittels Fishers Exakt-Test ermittelter signifikanter Unterschied der Tumorzinidenz zwischen I131- und Kontrollgruppe lag bei den J6F1-Mäusen vor (Tab. IV.8.-13.).

Während bei I131-behandelten Tieren (Tab. IV.7.a) **follikuläre Adenome** in allen beteiligten Mausgruppen mit einer Inzidenz zwischen 3 und 8 % vorkamen (die J6F1-Mäuse werden aufgrund der geringen Tierzahl gesondert betrachtet), handelte es sich bei lediglich einem (H6F1-) Kontrolltier um ein FA (Tab. IV.7.b).

**Follikuläre Karzinome** fanden sich bei den einzelnen Untersuchungsgruppen in ähnlicher Häufigkeit, mit 3 bis 16 % FK bei Radiojod-behandelten Mäusen (Tab. IV.7.a) und ebenfalls nur einem (J6F2-) Kontrolltier (Tab. IV.7.b).

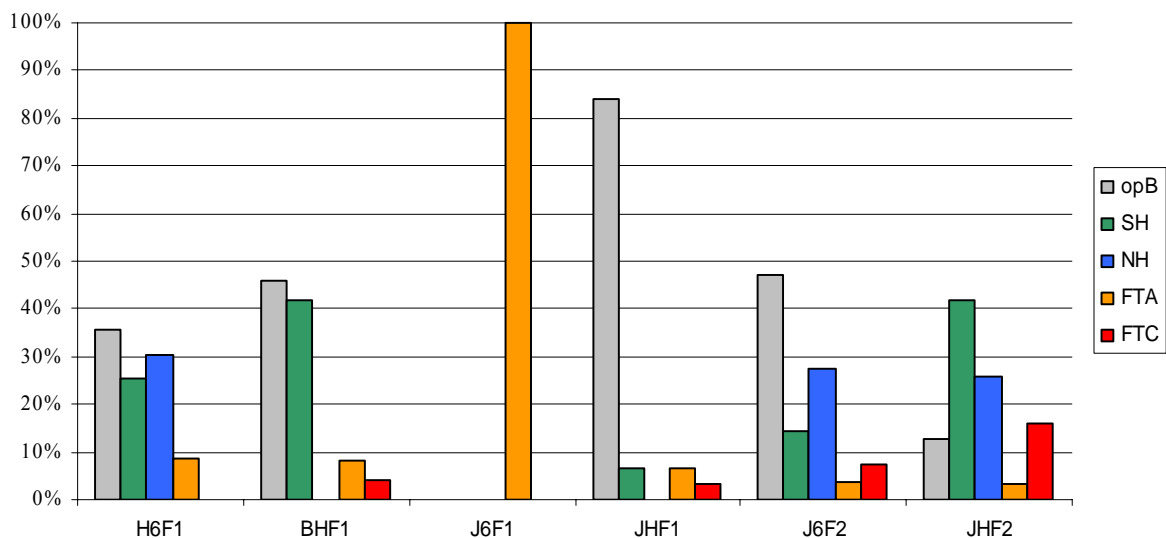
Bei einem Vergleich der analogen Kreuzungen der Radiojod-exponierten (Tab. IV.7.a) F1- und F2-Tieren (J6F1 und -F2, sowie JHF1 und -F2) fiel auf, dass bei einem reduzierten Anteil an FA in der Gruppe der F2-Tiere eine Verschiebung zu Gunsten eines erhöhten Anteils maligner Tumoren zu beobachten war. Neben vier solitären, solide bis mikrofollikulären FK (4/9), traten bei den F2-Mäusen drei Karzinome bilateral und drei Karzinome multizentrisch auf. Das seltene strahlenassoziierte Auftreten von Karzinomen bei F1-Tieren (Tab. IV.7.a) beschränkte sich auf jeweils ein Karzinom unter den BHF1- bzw. den JHF1-Mäusen und zeigte in beiden Fällen solitäres Auftreten mit solidem bis mikrofollikulärem Wachstum.

#### IV. ERGEBNISSE

**Tab. IV.7. und Abb. IV.7.** Verteilung der Diagnosen auf die verschiedenen Maushybridgruppen bei den

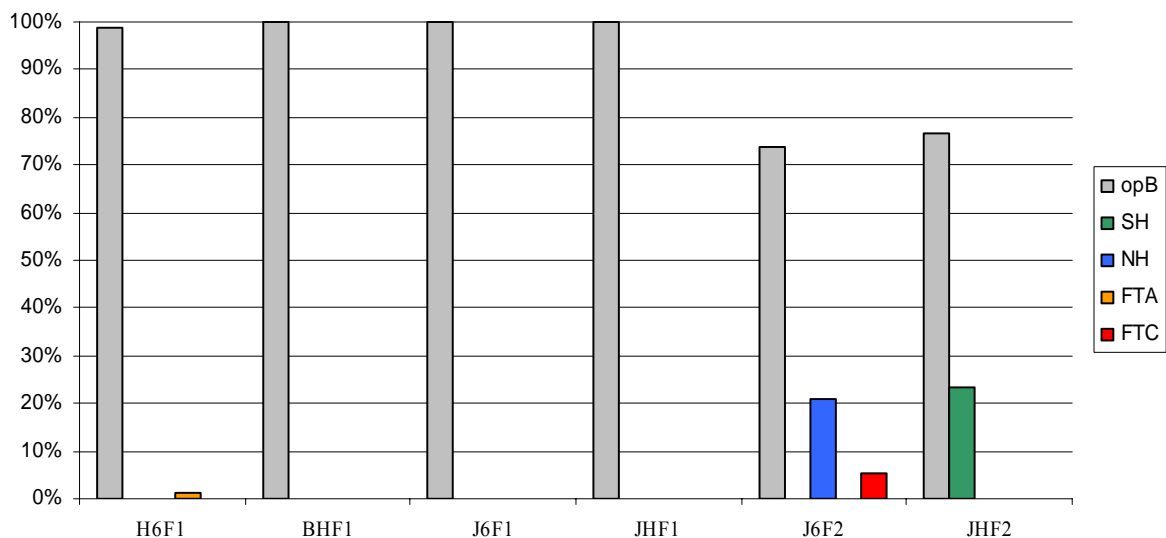
**a) Radiojod-behandelten Tieren:**

	H6F1 (n = 59)		BHF1 (n = 24)		J6F1 (n = 3)		JHF1 (n = 31)		J6F2 (n = 55)		JHF2 (n = 31)	
opB	21	36 %	11	46 %	-	-	26	84 %	26	47 %	4	13 %
SH	15	25 %	10	42 %	-	-	2	6 %	8	15 %	13	42 %
NH	18	31 %	-	-	-	-	-	-	15	27 %	8	26 %
FA	5	8 %	2	8 %	3	100%	2	6 %	2	4 %	1	3 %
FK	-	-	1	4 %	-	-	1	3 %	4	7 %	5	16 %



**b) Kontrolltieren:**

	H6F1 (n = 82)		BHF1 (n = 9)		J6F1 (n = 12)		JHF1 (n = 23)		J6F2 (n = 19)		JHF2 (n = 17)	
opB	81	99 %	9	100%	12	100%	23	100%	14	74 %	13	76 %
SH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	24 %
NH	-	-	-	-	-	-	-	-	4	21 %	-	-
FA	1	1 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FK	-	-	-	-	-	-	-	-	1	5 %	-	-



#### IV. ERGEBNISSE

##### 1.2.1.1. Befunde der H6F1-Hybridmäuse (Vgl. Anhang Tab. VIII.5.)

Die gesunden Schilddrüsen der H6F1-Hybridmäuse zeichneten sich durch variablen Follikeldurchmesser aus (Abb. IV.1.A.). Gutartige Schilddrüsenerkrankungen (NH und FA) traten in statistisch signifikant erhöhtem Umfang ( $p = 1,31 \times 10^{-9}$ ) in der Gruppe der I131-behandelten Mäuse (23 %) im Vergleich zur Kontrollgruppe (1 %) auf. Bei einem Vergleich zwischen der Anzahl induzierter und spontaner FA lag der ermittelte p-Wert von 0,08 jedoch unterhalb der modifizierten Signifikanzgrenze  $p'$  von 1,25 % (Tab. IV.8.). Innerhalb der Radiojod-behandelten Gruppe war der prozentuale Anteil an Mäusen mit proliferativen Erkrankungen bei weiblichen Tieren im Vergleich zu den Böcken deutlich erhöht, wobei die Inzidenz von NH in signifikantem Unterschied zwischen weiblichen (14/30) und männlichen (4/25) Tieren vorlag ( $p = 0,01 < 0,0125$ ).

**Tab. IV.8.** Histologische Befunde der H6F1-Mäuse (Fishers Exakt-Test: Signifikanzniveau  $p' = 0,0125$ ):

	I131-Mäuse			Kontrollmäuse			p-Wert
	weiblich	männlich	gesamt	weiblich	männlich	gesamt	
opB	7 (23 %)	14 (48 %)	21 (36 %)	39 (97 %)	42	81 (99 %)	$4,43 \times 10^{-18}$
SH	6 (20 %)	9 (31 %)	15 (25 %)	-	-	-	$6,52 \times 10^{-7}$
NH	14 (47 %)	4 (14 %)	18 (31 %)	-	-	-	$2,65 \times 10^{-8}$
FA	3 (10 %)	2 (7 %)	5 (8 %)	1 (3 %)	-	1 (1 %)	0,08 (n. s.)
	30	29	59	40	42	82	

##### 1.2.1.2. Befunde der BHF1-Hybridmäuse (Vgl. Anhang Tab. VIII.6.)

In der Gruppe der BHF1-Mäuse stellten sich die Follikel gesunder Schilddrüsen deutlich makrofollikulär dar und erschwerten die Abgrenzung von einer simplen Hyperplasie. Da keines der Kontrolltiere pathologische Veränderungen der Schilddrüse aufwies, war - analog zu den H6F1-Mäusen - der Unterschied des Auftretens proliferativer Erkrankungen (SH, FA und FK) zwischen den Radiojod-behandelten und den Kontrolltieren statistisch signifikant ( $p = 0,00504$ ), wohingegen bei lediglich drei Neoplasien innerhalb der I131-Gruppe (12 %) die Nullhypothese, dass Radiojod-Gabe mit Tumorinduktion korreliert zu verwerfen war ( $p = 0,5$ ; vgl. Tab. IV.9.). Im Gegensatz zu den H6F1-Hybriden waren es hier die Böcke, welche tendenziell bevorzugt von proliferativen Veränderungen bzw. ausschließlich von Neoplasien betroffen waren (Tab. IV.9.).

#### IV. ERGEBNISSE

**Tab. IV.9.** Histologische Befunde der BHF1-Mäuse (Fishers Exakt-Test: Signifikanzniveau  $p' = 0,0125$ ):

	I131-Mäuse			Kontrollmäuse			p-Wert
	weiblich	männlich	gesamt	weiblich	männlich	gesamt	
opB	5 (50 %)	6 (43 %)	11 (46 %)	4	5	9	0,00504
SH	5 (50 %)	5 (36 %)	10 (42 %)	-	-	-	0,03 (n.s.)
FA	-	2 (14 %)	2 (8 %)	-	-	-	0,5 (n.s.)
FK	-	1 (7 %)	1 (4 %)	-	-	-	
	10	14	24	4	5	9	

##### 1.2.1.3. Befunde der J6F1-Hybridmäuse (Vgl. Anhang Tab. VIII.7.)

Die zwölf Kontrolltiere zeigten unveränderte Schilddrüsen von eher mikrofollikulärem Aussehen, wohingegen in allen drei Fällen der I131-behandelten Mäuse adenomatöse Knoten vorhanden waren, so dass sich der Unterschied, anders als bei den übrigen Gruppen, in statistischer Signifikanz widerspiegelte (Fishers Exakt-Test,  $p = 0,002$ ; s. Tab. IV.10.). Bei zwei der Mäuse handelte es sich um atypische Adenome.

**Tab. IV.10.** Histologische Befunde der J6F1-Mäuse:

	I131-Mäuse			Kontrollmäuse			Gesamt
	weiblich	männlich	gesamt	weiblich	männlich	gesamt	
opB	-	-	-	8	4	12	12
FA	2	1	3	-	-	-	3
Gesamt	2	1	3	8	4	12	15

##### 1.2.1.4. Befunde der JHF1-Hybridmäuse (Vgl. Anhang Tab. VIII.8.)

Die gesunden Schilddrüsen der JHF1-Mäuse zeigten bevorzugt makrofollikuläre Morphologie. Obwohl ausschließlich in der I131-behandelten Gruppe diagnostiziert, lag keine statistische Signifikanz der Anzahl proliferativer Erkrankungen zwischen den beiden Untersuchungsgruppen vor ( $p > 0,0125$ ; vgl. Tab. IV.11.). Die Neoplasien wurden ausschließlich in weiblichen Mäusen der I131-Gruppe diagnostiziert. Die Nullhypothese, dass das Geschlecht der Tiere unabhängig von Radiojod-Exposition mit der Entstehung von Tumoren korreliert, konnte jedoch verworfen werden (bei 3 von 31 Weibchen und 0 von 23 Männchen mit Tumor,  $p = 0,3$ ).

#### IV. ERGEBNISSE

**Tab. IV.11.** Histologische Befunde der JHF1-Mäuse (Fishers Exakt-Test: Signifikanzniveau  $p' = 0,0125$ ):

	I131-Mäuse			Kontrollmäuse			p-Wert
	weiblich	männlich	gesamt	weiblich	männlich	gesamt	
opB	18 (82 %)	8 (89 %)	26 (84 %)	9	14	23	0,06 (n. s.)
SH	1 (4,5 %)	1 (11 %)	2 (6 %)	-	-	-	0,5 (n. s.)
FA	2 (9 %)	-	2 (6 %)	-	-	-	0,3 (n. s.)
FK	1 (4,5 %)	-	1 (3 %)	-	-	-	
	22	9	31	9	14	23	

##### 1.2.1.5. Befunde der J6F2-Hybridmäuse (Vgl. Anhang Tab. VIII.9.)

Neben einem spontanen FK waren auch NH in auffallend hoher Anzahl bei den nicht Radiojod-behandelten Kontrolltieren vorzufinden (21 %). Demzufolge war bei den J6F2-Hybriden der Unterschied zwischen induzierten (I131-Gruppe) und spontanen (Kontrollgruppe) Tumoren genauso wenig statistisch signifikant ( $p = 1$ ) wie bei einer Gegenüberstellung aller proliferativer Veränderungen (SH + NH + FA + FK) in den beiden Mausgruppen ( $p = 0,06$ , vgl. Tab. IV.12.).

**Tab. IV.12.** Histologische Befunde der J6F2-Mäuse (Fishers Exakt-Test: Signifikanzniveau  $p' = 0,0125$ ):

	I131-Mäuse			Kontrollmäuse			p-Wert
	weiblich	männlich	gesamt	weiblich	männlich	gesamt	
opB	14 (47 %)	12 (48 %)	26 (47 %)	7 (78 %)	7 (70 %)	14 (74 %)	0,06 (n.s.)
SH	5 (17 %)	3 (12 %)	8 (15 %)	-	-	-	0,10 (n.s.)
NH	7 (23 %)	9 (36 %)	16 (29 %)	1 (11 %)	3 (30 %)	4 (21 %)	0,41 (n.s.)
FA	2 (7 %)	-	2 (4 %)	-	-	-	
FK	2 (7 %)	1 (4 %)	3 (5 %)	1 (11 %)	-	1 (5 %)	
	30	25	55	9	10	19	

##### 1.2.1.6. Befunde der JHF2-Hybridmäuse (Vgl. Anhang Tab. VIII.10.)

Die Heterogenität der Morphologie der gesunden Schilddrüsen bei den F2-Hybriden findet sich in der Vielfalt pathologischer Erscheinungen (analog zu den J6F2-Mäusen) reflektiert. Der Umfang induzierter knotiger Läsionen (NH + FA + FK) in der I131-Gruppe wich im Gegensatz zum Umfang neoplastischer Veränderungen signifikant von dem der Kontrollgruppe ab ( $p = 0,00067$  bzw.  $p = 0,08$ ; vgl. Tab. IV.13). Weibliche Radiojod-behandelte Tiere zeigten sich in größerem prozentualen Anteil als männliche Tiere von Neoplasien betroffen (36 versus 10 %).

#### IV. ERGEBNISSE

**Tab. IV.13.** Histologische Befunde der JHF2-Mäuse (Fishers Exakt-Test: Signifikanzniveau  $p' = 0,0125$ ):

	I131-Mäuse			Kontrollmäuse			p-Wert
	weiblich	männlich	gesamt	weiblich	männlich	gesamt	
opB	1 (9 %)	3 (15 %)	4 (13 %)	10 (77 %)	3 (75 %)	13 (76 %)	0,000018
SH	4 (36 %)	9 (45 %)	13 (42 %)	3 (23 %)	1 (25 %)	4 (24 %)	0,34 (n. s.)
NH	2 (18 %)	6 (30 %)	8 (26 %)	-	-	-	0,04 (n. s.)
FA	1 (9 %)	-	1 (3 %)	-	-	-	0,08 (n. s.)
FK	3 (27 %)	2 (10 %)	5 (16 %)	-	-	-	
	11	20	31	13	4	17	

##### 1.2.2. Assoziation der Befunde mit dem genetischen Hintergrund der beteiligten Mausinzuchtstämme

Unter den Kontrolltieren lag der größte Anteil hyper- und neoplastischer Erkrankungen in Assoziation mit dem JF1-Inzuchtstamm (13 %) im Vergleich zu den Stämmen C3H (6 %) bzw. C57/BL6 (3 %) vor. Bei lediglich neun Tieren mit BALB/c-Hintergrund ist die statistische Aussagekraft in diesem Fall eingeschränkt.

Ebenfalls die Mäuse mit JF1-Abstammung zeigten mit 15 % gegenüber 12 % bei den übrigen Mausstämmen einen etwas höheren Anteil an Neoplasien bei den Radiojod-behandelten Tieren, und insbesondere die höchste Inzidenz maligner Tumoren (mit 8 % im Vergleich zu 3 bis 5 % bei den übrigen Mausstämmen).

Der Faktor der Inzidenzzunahme (RR) hyper- und neoplastischer Erkrankungen bei Radiojodapplikation liegt bei 4 (JF1), 8 (C57/BL6) und 15 (C3H). Demgegenüber steht ein RR von 15 (JF1), 6 (C57/BL6) und 12 (C3H) und für die Ausbildung von Tumoren bei Strahlenexposition.

##### 1.2.3. Assoziation der Tumorzinzidenz mit dem Geschlecht der Mäuse

Trotz fehlender Signifikanz zeigten innerhalb der H6F1- und der JHF1-Gruppe die Weibchen und innerhalb der BHF1-Gruppe die Männchen eine höhere Inzidenz an strahleninduzierten Schilddrüsentumoren (Fishers Exakt-Test:  $p > 0,05$ ), wohingegen bei den J6F1- und den F2-Hybriden kein Unterschied bezüglich sexusbedingter Suszeptibilität für strahleninduzierte Schilddrüsentumorentstehung bestand. Die bei separater Betrachtung der verschiedenen Mauslinien (Abschnitte 1.2.1.1. - 1.2.1.6.) geschlechterspezifisch unterschiedliche Neigung, Schilddrüsentumoren auszubilden war bei einer Gegenüberstellung sämtlicher Mäuse nicht erkennbar (Fishers Exakt-Test:  $p > 0,05$ ).

#### IV. ERGEBNISSE

##### 1.2.4. Assoziation der Befunde mit dem Alter der Mäuse

Das Alter der Mäuse lag im Mittel bei 469 Tagen mit einer Standardabweichung von 81 Tagen. Insgesamt wurden 27 (7 %) Tiere unterhalb und 338 (93 %) Tiere innerhalb des Altersdurchschnitt ( $469 \pm 81$  Tage) untersucht. Die signifikant unter dem Altersdurchschnitt ( $< 388$  Tage) liegenden I131-Mäuse zeigten einen geringgradig größeren Anteil hyperplastischer Erkrankungen (52 %) als die älteren I131-Mäuse (43 %), wobei im Gegensatz zu den im Altersdurchschnitt (388 bis 544 Tage) befindlichen Tieren noch keine Karzinogenese zu erkennen war (s. Tab. IV.14.). Die beiden jüngsten Tiere mit FA waren 420 (Nr. 434, Kontrolltier) und 468 (I131-Gruppe) Tage alt. FK waren erstmals bei Mäusen in einem Alter von 471 Tagen nachweisbar. Das einzige Kontrolltier mit FK war 476 Tage alt.

**Tab. IV.14.** Inzidenz der Befunde in Abhängigkeit vom Alter (Altersdurchschnitt =  $MW \pm \sigma$  = 388 bis 550 Tage):

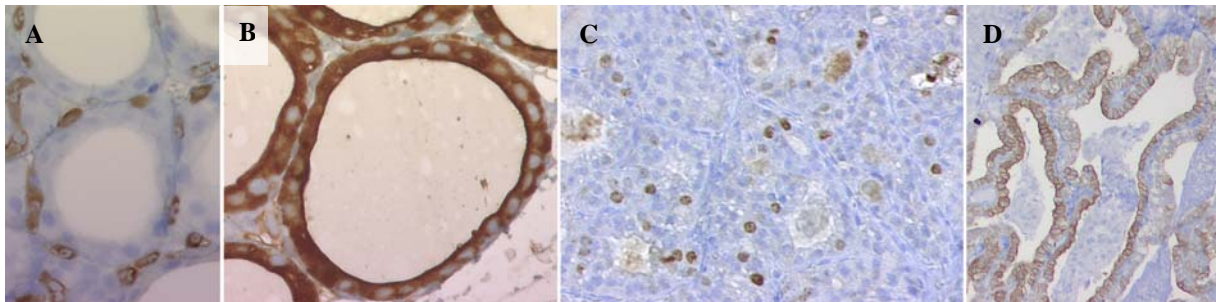
	Jüngere Tiere ( $< 388$ Tage)		Ältere Tiere ( $\geq 388$ Tage)	
	I131-Gruppe	Kontrollgruppe	I131-Gruppe	Kontrollgruppe
opB	9 (47 %)	7 (88 %)	79 (42 %)	145 (94,2 %)
SH	5 (26 %)	-	43 (23 %)	4 (2,6 %)
NH	5 (26 %)	1 (2 %)	36 (20 %)	3 (1,9 %)
FA	-	-	15 (8 %)	1 (0,6 %)
FK	-	-	11 (6 %)	1 (0,6 %)
	19	8	184	154

### **1.3. Ergebnisse der Immunhistochemie (IHC)**

Mittels Thyroglobulin- und / oder Calcitonin-Antikörpern ließ sich die Follikelzell-Herkunft eines solide wachsenden Knotens in Abgrenzung zum medullären Tumor stützen. Dieser Nachweis ist bei erkennbarem Vorhandensein follikulärer Strukturen obsolet (z. B. Abb. IV.3.A.) und wurde daher nur in zwei Fällen (Nr. 951, 780) ergänzend durchgeführt. Beide Antikörper zeigten spezifische zytoplasmatischen Reaktion bei den entsprechenden endokrinen Zellpopulationen (Abb. IV.9.A. und B.).

Eine Bestätigung der erhöhten proliferativen Aktivität mittels immunhistochemischen Ki67-Nachweis war im Falle der Diagnostik von fünf FK (Nr. 612, 793, 961, 669, Abb. IV.9.C.) in Unterscheidung zu vier NH (Nr. 655, 867, 875, 876) und einem FA (874) mit fehlender, sowie einem atypischen FA (Nr. 653) mit auf wenige Zellen beschränkter Ki67-Reaktivität von Nutzen. Eine unterschiedliche Graduierung der Mitoserate in Abhängigkeit vom Wachstumsmuster war nicht erkennbar. Die höchste mitotische Aktivität war zumeist in der Tumorperipherie zu finden.

Auf Cytokeratin 19- und Galectin-3-Positivität hin wurden fünf (zwei FK und drei FK) bzw. drei (ein FA und zwei FK) murine Tumoren überprüft, zeigten jedoch im Gegensatz zu den als Kontrolle dienenden humanen PK (Abb. IV.9.D.) keine Reaktivität.



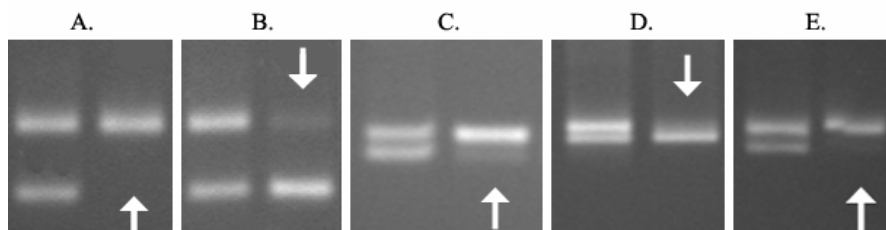
**Abb. IV.9. IHC:** **A.** und **B.** Thyroglobulin und Calcitonin bei einer gesunden Mäuseschilddrüse (640x HE): Die Calcitonin-positiven c-Zellen liegen parafollikulär und zeigen genauso spezifische zytoplasmatische Reaktion wie die Thyreozyten mit Thyroglobulin-Antikörpern (dunkelbraun). **C.** Die nukleäre Ki67-Positivität ist bei einem murinen multizentrischen FK in zahlreichen Zellen erkennbar (Fall-Nr. 961, 400x HE). **D.** Ein humanes PK zeigt spezifische Reaktion mit Cytokeratin 19-Antikörpern (160x HE).



## 2. Ergebnisse der LOH- (loss of heterozygosity-) Studie

LOH-Untersuchungen zur Detektion von Mikrosatelliten-Instabilität im Tumorgewebe wurden bei insgesamt 30 Mäusen der H6F1-Gruppe (29 radiojodbehandelte Mäuse [sechs gesunde Schilddrüsen, neun SH, zehn NH, fünf FA] und ein Kontrolltier mit FA), sowie sieben BHF1- (eine gesunde Schilddrüse, drei SH, zwei FA und ein FK) und drei J6F1-Mäusen (drei FA) durchgeführt (s. Anhang Tab. VIII.3.). Bei 14 von 35 verschiedenen Mikrosatelliten-Markern für neun Loci (Chromosomen, Chr.) war ein Allelverlust (Verlust der Heterozygotie, LOH) nachweisbar.

Von den insgesamt elf analysierten Tumoren zeigten drei (27 %) Fälle LOH, auf jeweils einem, zwei bzw. vier Loci. Bei vier der zehn NH lag ein LOH auf einem Locus mit dem auf Chromosom 14 kartierenden Marker D14Mit125 vor (40 %). Jeder der betroffenen Fälle gehörte der Gruppe der H6F1-Mäuse an (Anhang Tab. VIII.11.). Mikrosatelliten-Instabilität (MSI) mit veränderter Sequenzlänge wurde nicht beobachtet. Die folgende Abbildung stellt repräsentative Beispiele der Gelelektrophoresbilder einiger Fälle dar:



**Abb. IV.9.** Beispiele für Allelverluste (LOH, Pfeile) in der Gruppe der Radiojod-exponierten H6F1-Mäuse bei Darstellung der Banden im Gelelektrophoresebild: Das heterozygote Normalgewebe (Schwanzspitzen) befindet sich jeweils links und die dazugehörigen Schilddrüsenläsion rechts. **A.** D14Mit125, Fall-Nr. 920 NH. **B.** D14Mit125, Fall-Nr. 653 FA. **C.** D5Mit345, Fall-Nr. 934 FA. **D.** D4Mit166, Fall-Nr. 934 FA. **E.** D5Mit349, Fall-Nr. 653 FA. Bei den Beispielen B. und D. liegt eine Deletion des längeren Allels vor (Laufrichtung von oben nach unten) und bei den Fällen A., C. und E. ein Verlust des kürzeren Allels.

Beim Vergleich der untersuchten Mauslinien konnte in Bezug auf die Anzahl der Adenome, bei welchen mindestens ein Mikrosatelliten-Locus deletiert vorlag, kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (3/4 H6F1 versus 0/6 BHF1 und J6F1,  $p = 0,2$ ), obwohl LOH ausschließlich in der Gruppe der H6F1-Mäuse detektiert wurde. Gleiches galt für den Unterschied zwischen den Geschlechtern (1/7 [14 %] Weibchen versus 2/10 [20 %] Männchen,  $p > 0,05$ ) und in Hinblick auf die histologische Diagnose (4/10 [40 %] NH versus 3/11 [27 %] FA).

Ein signifikanter Unterschied der kumulativen LOH-Inzidenz je Locus hingegen war zwischen den der Kontrolle dienenden Fällen (ohne pathologischen Befund und SH)

#### IV. ERGEBNISSE

gegenüber knotig veränderten Schilddrüsen (NH und FA) nachweisbar ( $p < 0,05$ ). Die vergleichende Untersuchung der Anzahl an Loci mit LOH in Abhängigkeit von den verschiedenen untersuchten Variablen ergab eine signifikante Erhöhung ( $p < 0,05$ ) der LOH bei Adenomen der H6F1-Tiere (sieben LOH bei fünf FA à neun Loci) im Vergleich zu den Tumoren der beiden anderen Untersuchungsgruppen BHF1 und J6F1 (kein LOH bei sechs FA à fünf bzw. sieben Loci, s. Tab. IV.15.).

Ebenfalls eine signifikante Korrelation ( $p < 0,05$ ) bestand bei separater Betrachtung der Geschlechter (Tab. IV.15.): Während unter den Weibchen eines von sieben FA auf lediglich einem (2 %) Locus von Chr. 19 einen Allelverlust aufwies (Fall 869), waren es bei den zwei von zehn betroffenen Tumoren der männlichen Tiere insgesamt sechs (17 %) deletierte Loci bei Fall 934 auf Chr. 4 und 5 und bei Fall 653 auf Chr. 4, 6, 11, 14.

Keine Signifikanz war in Abhängigkeit von der histologischen Diagnose zwischen NH (zehn Fälle mit vier deletierten von 90 Loci [4 %]) und FA (elf Fälle mit sieben deletierten von 73 Loci [10 %]) festzustellen ( $p > 0,05$ , Tab. IV.15.).

Ein aussagekräftiger Vergleich zwischen spontanen und strahlenassoziierten FA ist bei nur einem der Untersuchung zur Verfügung stehenden FA (Fall 951) bei einem nicht Radiojod-behandelten Tier nicht möglich ( $p = 0,6$ ).

**Tab. IV.15.** Beziehungen zwischen Loci mit LOH und den verschiedenen Untersuchungsgruppen:

Untersuchungsgruppen:		Loci mit LOH (in %)	OR (RR)	p-Wert
Mauslinien:	H6F1 (5 FA, 9 Loci)	7/45 (16 %)		
	BHF1 (2 FA, 5 Loci)	0/10	Div0	0,3 (im Vgl. zu H6)
	J6F1 (4 FA, 7 Loci)	0/28		0,04 (im Vgl. zu H6)
Geschlecht:	Weiblich (6 FA)	1/46 (2 %)	0,11 (0,17)	0,04
	Männlich (5 FA)	6/35 (17 %)		
Histologie:	NH (10)	4/90 (4 %)	0,45 (0,57)	0,2 (n. s.)
	FA und FK (11)	7/73 (10 %)		
I131-Gabe:	I131-Gruppe (9 FA, 1 FK)	7/50 (14 %)	Div0	0,6 (n. s.)
	Kontrollgruppe (1 FA)	0/9		

Legende: OR = Odds Ratio, RR = relatives Risiko, Div0: Angabe wegen Divisor Null nicht möglich

##### 2.1. LOH-Profil bei den H6F1-Mäusen

Die Ergebnisse der insgesamt 30 untersuchten H6F1-Mäuse sind als Grundlage für die statistischen Berechnungen dem Anhang Tabelle VIII.11. zu entnehmen. Allelverluste waren in Abhängigkeit von der Diagnose zunehmend nachweisbar: Während bei den sechs gesunden Schilddrüsen und den neun simplen Hyperplasien keine Allelverluste vorlagen, waren sie bei vier von zehn (40 %) nodulären Hyperplasien und drei der vier strahlenassoziierten Adenome

#### IV. ERGEBNISSE

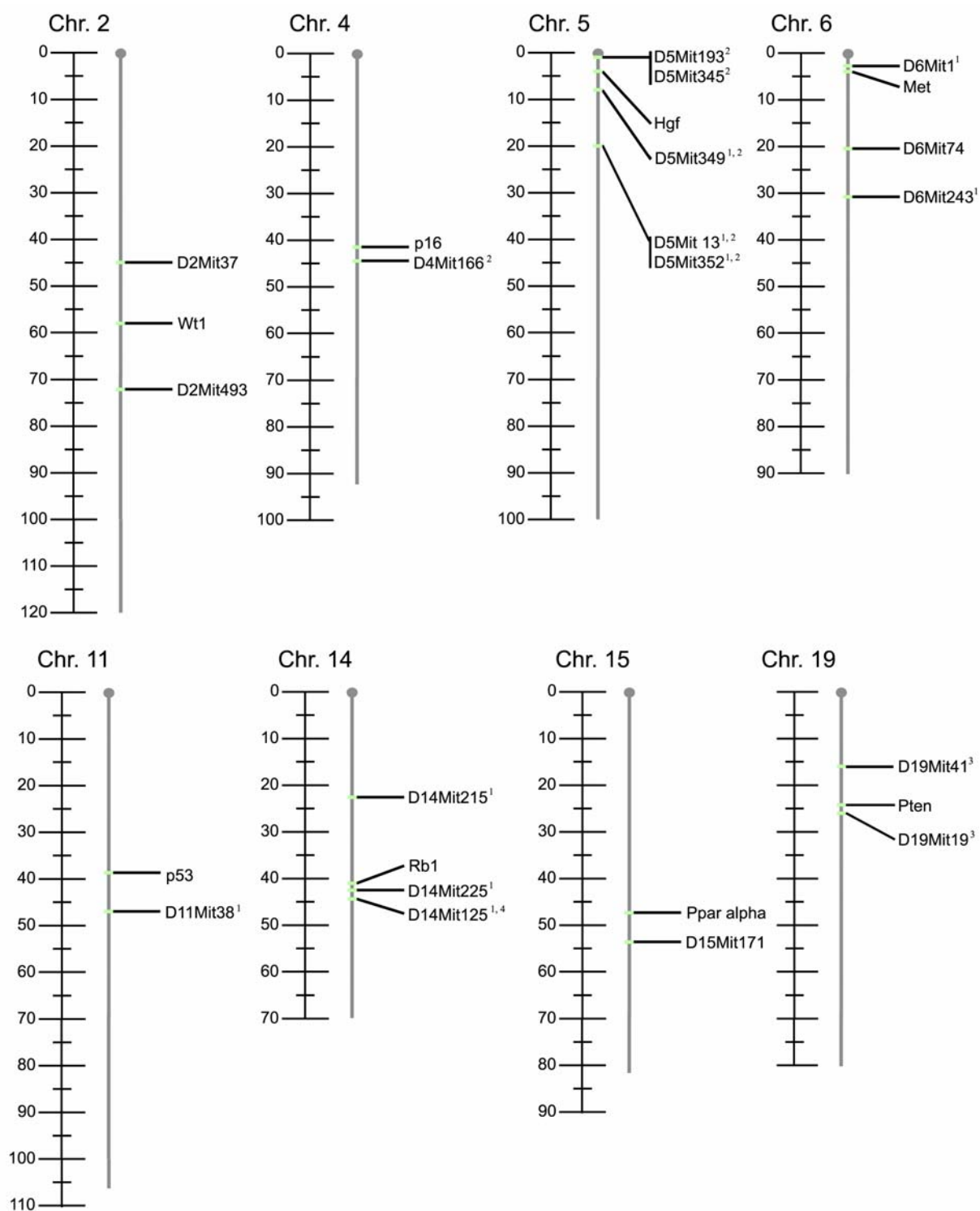
(75 %) vorhanden, nicht jedoch bei dem einzigen FA der unbehandelten Kontrollgruppe (Nr. 951). Die Anzahl betroffener Tiere zeigte hierbei eine signifikante Assoziation mit der histologischen Diagnose (0/16 opB und SH versus 7/15 NH und FA,  $p = 0,002$ ), jedoch keine Signifikanz in Abhängigkeit vom Expositionsstatus (3/4 strahlenassoziierten FA versus 0/1 nicht-strahlenassoziierten FA,  $p = 0,4$ ).

Von den insgesamt eingesetzten 27 Mikrosatelliten-Markern (auf neun verschiedenen Loci) waren bei 14 (52 %) Markern (entspricht sechs Loci) LOH nachweisbar (Tab. IV.16.). Abbildung IV.10. stellt ergänzend die genomische Lokalisation einiger Mikrosatelliten-Marker dar. Betroffen waren auf einem Locus (Chr. 5) zwei der vier strahlenassoziierten FA (50 %) und auf den übrigen Loci (Chr. 4, 11, 14 und 19) jeweils nur eines der FA. Zusätzlich lag in vier Fällen mit NH (40 %) ein auf die PCR-Amplifikate eines einzigen Markers (D14Mit125) beschränkter Allelverlust vor. Derselbe Marker zeigte überdies isolierte Homozygotie im Normalgewebe bei drei weiteren Fällen (Anhang Tab. VIII.11.).

**Tab. IV.16.** Häufigkeit und prozentualer Anteil der Fälle mit LOH aus der Gruppe der H6F1-Mäuse in Abhängigkeit von der histologischen Diagnose. LOH konnte bei folgenden 14 Mikrosatelliten-Markern ermittelt werden:

Lokalisation der Marker:		opB und SH (n = 20)	NH (n = 10)	FA [ $I^{131}$ ] (n = 4)	FA [I] (n = 1)
Chr. 4	D4Mit166	0	0	1 (25 %)	0
Chr. 5	D5Mit193	0	0	1 (25 %)	0
	D5Mit345	0	0	1 (25 %)	0
	D5Mit349	0	0	1 (25 %)	0
	D5Mit13	0	0	2 (50 %)	0
	D5Mit352	0	0	2 (50 %)	0
Chr. 6	D6Mit1	0	0	1 (25 %)	0
	D6Mit243	0	0	1 (25 %)	0
Chr. 11	D11Mit38	0	0	1 (25 %)	0
Chr. 14	D14Mit125	0	4 (40 %)	1 (25 %)	0
	D14Mit225	0	0	1 (25 %)	0
	D14Mit215	0	0	1 (25 %)	0
Chr. 19	D19Mit19	0	0	1 (25 %)	0
	D19Mit41	0	0	1 (25 %)	0

#### IV. ERGEBNISSE



**Abb. IV.10.** Lokalisation der Mikrosatelliten-Marker und einiger Kandidatengene auf den Chromosomen (Chr.)

2, 4, 5, 6, 11, 14, 15 und 19. Skalierung der Chromosomen in cM (Zentimorgan). Marker mit LOH:

<sup>1</sup>Fall Nr. 653 (FA), <sup>2</sup>Fall Nr. 934 (FA), <sup>3</sup>Fall Nr. 869 (FA), <sup>4</sup>Fälle Nr. 920, 922, 923 und 03/1920 (NH).

#### IV. ERGEBNISSE

Bei Betrachtung der kumulativen LOH-Inzidenz je Locus bestand eine deutliche Korrelation der histologischen Diagnose mit dem Umfang detektierter LOH ( $p = 0,04$ ; Tab. IV.17.). Statistische Signifikanz in Abhängigkeit vom Expositionsstatus (Radiojodgabe) ließ sich jedoch bei dem geringen Probenumfang nicht ablesen ( $p = 0,3$ ; Tab. IV.3.).

**Tab. IV.17.** Beziehungen zwischen Loci mit LOH und den verschiedenen Untersuchungsgruppen:

Untersuchungsgruppen:		Loci mit LOH (in %)	OR (RR)*	p-Wert
Histologie:	NH (n = 10)	4/90 (4 %)	0,25 (0,57)	0,04
	FA (n = 5)	7/45 (16 %)		
I131-Gabe (FA):	I131-Gruppe (4)	7/36 (19 %)	Div0	0,3
	Kontrollgruppe (1)	0/9		

\*OR = Odds Ratio, RR = relatives Risiko

Div0: Angabe wegen Divisor Null nicht möglich

Die anhand der Lokalisation der Mikrosatelliten-Marker determinierten Regionen mit Deletion sind aus Tabelle IV.4. abzulesen und ergänzend in graphischer Abbildung (IV.10.) dargestellt. Auf Chromosom 5 zeigten zwei strahlenassoziierte FA Allelverluste, so dass die gemeinsam deletierte Region von 4.238.967 bis mindestens 37.712.583 bp reicht. Bei Fall 653 war auf Chromosom 6 ein sog. „Zebra-Muster“ zu erkennen, mit LOH zweier Marker, wobei ein nicht deletierter Marker dazwischen kartierte (Abb. IV.10.).

Ob der limitierten Probenmaterialmenge war es in den meisten Fällen nicht möglich, die Grenzen der deletierten Regionen abschließend zu eruieren (Tab. IV.18.).

**Tab. IV.18.** Insgesamt umfassende Regionen [bp] der LOH je Fall und Chromosom. In der Spalte Lokalisation sind offene Grenzen mit Pfeilen in die jeweilige Richtung dargestellt. Wenn sich die Grenze anhand eines angrenzenden Markers ohne LOH einschränken ließ, sind eckige Klammern gesetzt:

Fall-Nr.	Chromosom (Marker mit LOH)	Lokalisation in bp	Kandidatengen
934 FA	4 (D4Mit166)	← 93.366.875 bis 93.367.013 →	p16
	5 (D5Mit345, 193, 349, 352 und 13)	← 4.229.461 bis 37.712.583 →	Hgf
653 FA	5 (D5Mit349, 352 und 13)	[ 4.238.967 bis 37.712.583 →	Hgf
	6 (D6Mit1 und 243, ohne D6Mit74)	← 15.094.274 bis 48.656.142 ]	Met
		[48.656.291 bis 72.244.519 →	
	11 (D11Mit38)	← bei 49cM* →	p53
NH <sup>1</sup>	14 (D14Mit215, 225 und 125)	← 57.321.174; 86.458.237 →	Rb1
	14 (D14Mit125)	[ 73.664.489; 86.458.237 →	Rb1
869 FA	19 (D19Mit41 und 19)	← 18.743.419 ; 39.493.267 →	Pten

<sup>1</sup>NH = noduläre Hyperplasien der Fälle 920, 922, 923 und 03/1920

\*für Marker D11Mit38 ist die Lokalisation in bp unbekannt

## IV. ERGEBNISSE

### 2.2. LOH-Profil bei den BHF1- und J6F1-Mäusen

Innerhalb der beiden Untersuchungsgruppen der BHF1- und J6F1-Mäuse konnte bei insgesamt einer gesunden Schilddrüse, drei SH, fünf FA und einem FK kein Allelverlust mittels der angewandten Mikrosatelliten-Marker detektiert werden (s. Tab. IV.19.a und b).

**Tab. IV.19.** Ergebnisse der LOH-Studie bei den

**a) BHF1-Mäusen:**

Fall-Nr.	Marker:	D2	D2	D5	D5	D11	D11	D14	D14
		Mit37	Mit272	Mit345	Mit349	Mit35	Mit177	Mit34	Mit69
828	FA	0	0	0	0	0	0	0	0
829	FK	0	-	0	0	0	-	-	0
846	FA	0	0	0	0	0	0	0	0
847	opB	0	0	0	0	0	0	0	0
848	SH	0	0	0	0	0	0	0	0
850	SH	0	0	0	0	0	0	0	0
855	SH	0	-	0	0	0	-	-	0

**b) J6F1-Mäusen:**

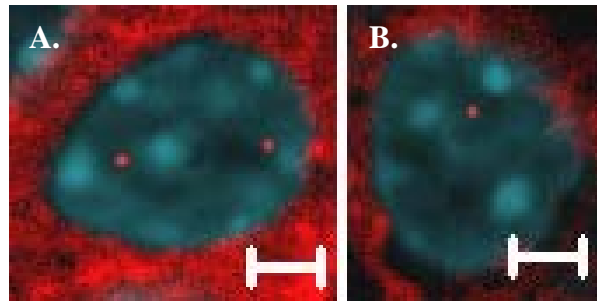
Fall-Nr.	Marker:	D2	D2	D5	D6	D14	D14	D15	D19	D19
		Mit37	Mit493	Mit1	Mit74	Mit215	Mit69	Mit171	Mit40	Mit17
931 a	FA	0	0	0	0	0	0	0	0	0
931 b	FA	0	0	0	0	0	0	0	0	0
932	FA	0	0	0	0	0	0	0	0	0
933	FA	0	0	0	0	-	-	0	0	-

Legende: 0 = keine LOH, „-“ = zu wenig DNA

### 3. Ergebnisse der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Als Ergänzung zur LOH-Studie wurde in acht Fällen der Radiojod-exponierten H6F1-Mäuse eine FISH-Analyse für den *Rb1*-Locus auf Chromosom 14 durchgeführt. Es handelte sich hierbei um sechs Fälle mit komplexer Hyperplasie und zwei Adenome. Die weiterführende Studie konnte einen Verlust des *Rb1*-Genes jedoch nicht verifizieren, auch nicht in den Fällen, welche bei in der Nähe kartierenden Mikrosatelliten-Markern LOH gezeigt hatten (Fall-Nr. 653, 920, 922, 923 und 1920; vgl. Abschnitt 2.1.). In Abbildung IV.11. sind die Signale der Rb1-Sonde exemplarisch dargestellt.

#### IV. ERGEBNISSE



**Abb. IV.11.** Intranukleäre FISH-Signale mit der Rb1-Sonde im Schilddrüsengewebe (Skala 2  $\mu$ m): **A.** In dem Nukleus sind beide Rb1-Allele, erkennbar an zwei Signalen, vorhanden (Fall-Nr. 922 NH [I<sup>131</sup>]). **B.** Dieser Zellkern enthält nur ein Signal infolge Deletion des zweiten Allels (Fall-Nr. 653 FA [I<sup>131</sup>]).

Die mittlere Anzahl (MW) an Zellkernen mit deletiertem *Rb1*-Locus betrug 16,4 % und wich nicht signifikant von der des umgebenden Normalgewebes (13,5 %) ab (s. Tab. IV.20.). Der maximale Anteil an Zellkernen mit Deletion (30 %) war bei einem FA (Nr. 653) auffindbar, welcher jedoch unterhalb der Signifikanzgrenze von 33,3 (Mittelwert im Normalgewebe + dreifache Standardabweichung  $\sigma$ ) lag (s. Tab. IV.20.).

**Tab. IV.20.** Ergebnis der Auszählung der Signale in den Zellkernen:

Fall-Nr.	Schilddrüsengewebe: Relative Anzahl (in %) der Zellkerne mit:			dazugehöriges Normalgewebe: Relative Anzahl (in %) der Zellkerne mit:		
	Deletion (1 Signal)	Disomie (2 Signale)	mind. 3 Signale	Deletion (1 Signal)	Disomie (2 Signale)	mind. 3 Signale
Interphasen				2,0	95,0	3,0
Lymphozyten				12,0	88,0	0
869 FA	17,5	79,9	2,6	-	-	-
875 NH	13,9	83,5	2,5	14,0	84,0	2,0
876 NH	21,1	76,7	2,3	25,0	75,0	0
653 FA <sup>1</sup>	<b>30,0</b>	68,0	2,0	9,3	90,7	0
920 NH <sup>1</sup>	13,6	86,4	0	10,1	89,9	0
922 NH <sup>1</sup>	8,0	90,0	2,0	10,0	90,0	0
923 NH <sup>1</sup>	14,3	82,9	2,9	16,0	78,0	6,0
1920 NH <sup>1</sup>	13,0	87,0	0	22,5	77,5	0
MW	16,4	81,8		13,4	85,3	
$\sigma$	6,6			6,6		
MW + 3 $\sigma$				<b>33,3</b>		

Legende:

<sup>1</sup>Fälle mit LOH in der Nähe des *Rb1*-Locus auf Chr. 14

MW = Mittelwert

$\sigma$  = Standardabweichung,

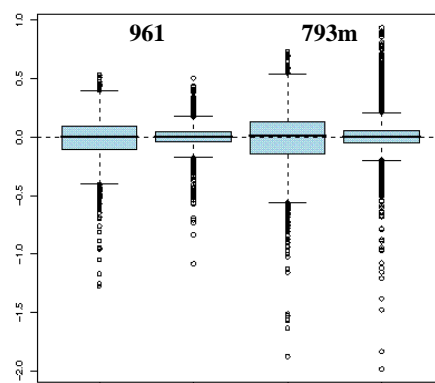
#### 4. Ergebnisse der komparativen genomische Hybridisierung (CGH)

Array-CGH-Analyse wurde mit insgesamt 25 verschiedenen Gewebeproben aus 21 verschiedenen Mäusen der F2-Gruppen (JHF2, J6F2) durchgeführt. Hierbei handelte es sich um zwei gesunde Schilddrüsen, eine SH, 12 NH, zwei FA und acht FK (s. Anhang Tab. VIII.4.).

##### 4.1. Vergleich der Hybridisierung mit aus Formalin-fixiertem und aus unfixiertem (Schwanzspitzen) Gewebe isolierter Referenz-DNA

Im Rahmen eines Vorversuches erfolgte mit zwei Proben (Nr. 961 und 793m) eine zweimalige Hybridisierung desselben Schilddrüsentumors, jeweils mit aus mikrodiseziertem Formalin-fixiertem, Paraffin-eingebettetem (FFPE-) Gewebe und aus unfixiertem Schwanzspitzen-Gewebe (TT) isolierter Referenz-DNA, um die Qualität der ermittelten Array-Daten einer vergleichenden Betrachtung zu unterziehen.

Die Streuung der ermittelten  $\log_2$ -Werte fiel bei Hybridisierung mit aus FFPE-Gewebe gewonnener DNA deutlich geringer aus (s. Abb. IV.12.). Geringere Variabilität der Daten führte zu verbesserter Spezifität bezüglich Identifizierung tatsächlicher genetischer Aberrationen in Abgrenzung zu zufälligen streuungsbedingten Artefakten (Reduktion falsch-positiver Ergebnisse). Demzufolge fand für alle nachfolgenden Experimente die aus FFPE gewonnene DNA als Referenz-Probe Anwendung.



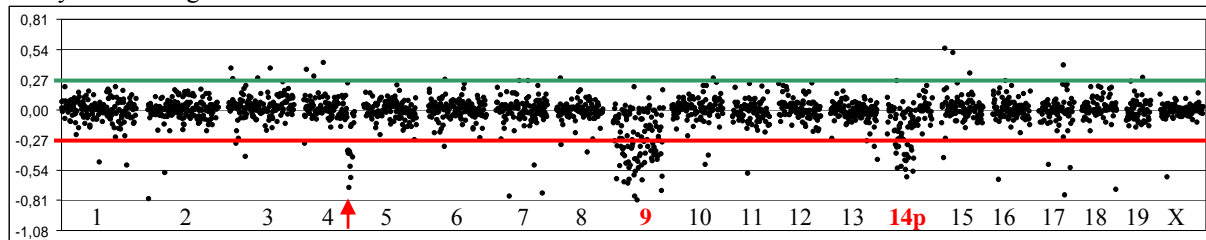
**Abb. IV.12.** Box Plots der Proben 961 [ $I^1$ ] und 793m [ $I^{131}$ ], jeweils mit Schwanzspitzen- (links) und FFPE-Gewebe (rechts) als Referenz-DNA. Im Box Plot ist die Streuung der Array-Daten anhand der Quantile erkennbar. Die Box Plots zeigen in beiden Fällen deutlich engere 25 %- und 95 %-Quantile bei Verwendung von FFPE-Referenzgewebe.



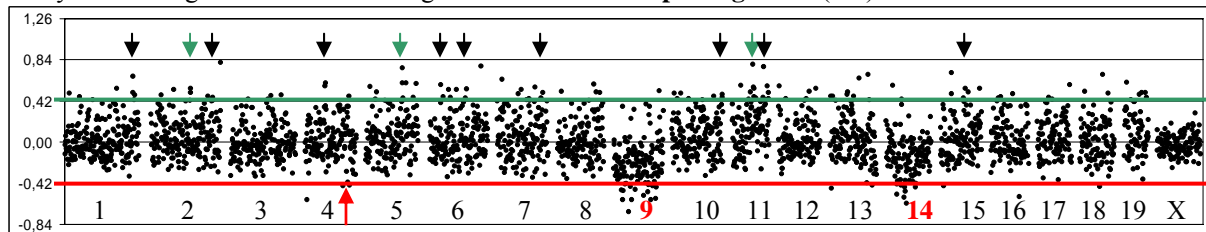
#### IV. ERGEBNISSE

Die CGH-Profile beider zum selben Fall gehöriger Arrays zeigten gute Übereinstimmung (Pearson's Korrelationstest) bezüglich der mehrere ( $> 3$ ) aufeinander folgende BAC-Klone betreffenden Veränderungen, wohingegen kleine Alterationen von bis zu drei konsekutiven BACs keine Reproduzierbarkeit zeigten und in den „Schwanzspitzen-Arrays“ beider Proben zahlreich vorhanden waren (vgl. Abb. IV.13.). Dementsprechend lag der Fokus nachfolgender Analysen auf Alterationen, die mehr als drei BAC-Klone umfassten.

##### A. Hybridisierung mit DNA aus mikrodissiziertem FFPE-Gewebe:



##### B. Hybridisierung mit DNA aus frisch gefrorenem Schwanzspitzengewebe (TT):



**Abb. IV.13.** Die Punkt-Diagramme der Probe **793m FK** [ $I^{131}$ ] stellen sämtliche  $\log_2$ -Ratios der einzelnen BAC-Klone in der ihrer Lokalisation entsprechenden Reihenfolge für jedes Chromosom (19 + X) dar. Die Skalierung entspricht dem jeweiligen Schwellenwert ( $SW_{FFPE} = 0,27$ ;  $SW_{TT} = 0,42$ ). **A.** Die deutlich erkennbaren Veränderungen bei Hybridisierung mit Referenz-DNA aus FFPE (kleine Deletion konsekutiver BACs auf Chr. 4 [Pfeil], Chr. 9-Verlust und partieller Verlust des Chr. 14) stellen sich bei **(B.)** Hybridisierung mit frisch gefrorener Referenz-DNA (Schwanzspitzen) in verminderter Qualität dar. Zudem ist eine erheblich größere Anzahl oberhalb des Schwellenwerts verstreuter BACs erkennbar, wobei es sich in neun Lokalisationen um je zwei (schwarze Pfeile), und dreimal um je drei (grüne Pfeile) aufeinander folgende BAC-Klone handelt.

#### 4.2. Festlegung der Analyse Kriterien für „kleine“ Alterationen

Als flexibler symmetrischer Schwellenwert wurde für jede Hybridisierung die zweifache Standardabweichung ( $2\sigma$ ) vom Mittelwert ( $MW = 0$ ) definiert, um im Ergebnis eine optimale Proben-abhängige Detektion genomischer Veränderungen mit minimalen Hintergrund-Artefakten zu erzielen (Vgl. Abschnitt III.6.5.2.). Eine Auflistung der Schwellenwerte je nach Probe ist in Tabelle IV.21. enthalten. Die Standardabweichung aller CGH-Arrays betrug im Durchschnitt 0,145, mit einem Minimum von 0,045, einem Maximum von 0,242 und einer Varianz von 0,0027.

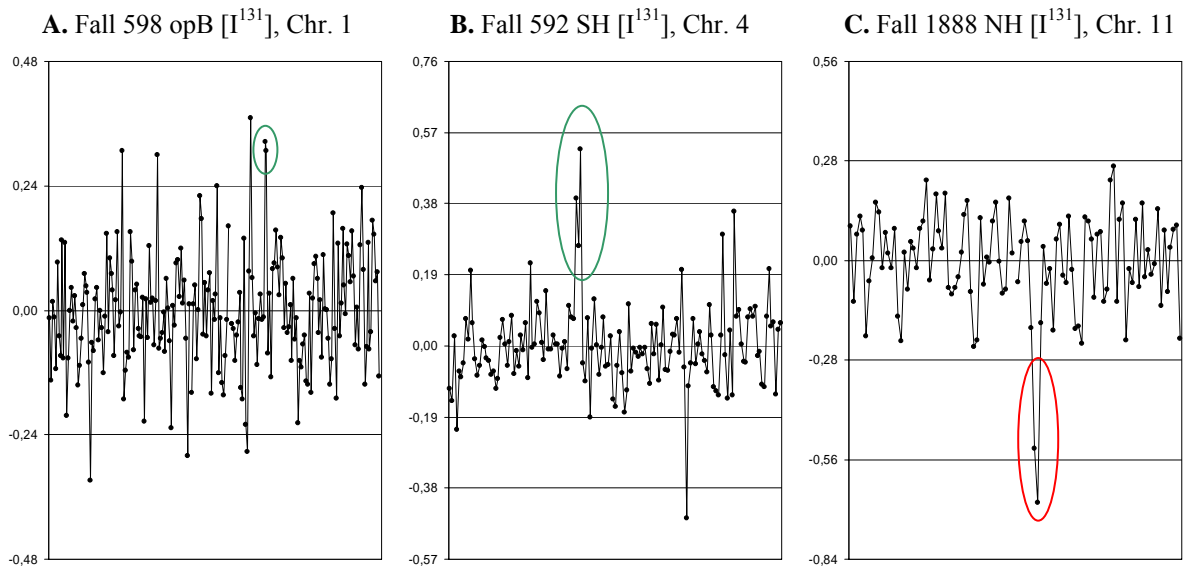
#### IV. ERGEBNISSE

Der Anteil an BAC-Klonen mit jenseits des Schwellenwerts liegender  $\log_2$ -Ratio belief sich durchschnittlich auf 5 % (zwischen 3,2 und 7,2 %; Tab. IV.21.). Nur Alterationen, bei welchen aufeinander folgende BAC-Klone betroffen waren, galten als potentielle Kandidaten für das Vorliegen echter genomischer Alterationen von Tumoren, welche in der Regel große Chromosomenregionen betreffen. Wie Tabelle IV.21. zu entnehmen ist, zeigten sich Alterationen von zwei konsekutiven BAC-Klonen in variabler Lokalisation auch in den als Kontrolle dienenden gesunden Schilddrüsen, so dass ausschließlich Veränderungen von mindestens drei konsekutiven BACs als von ausreichender Signifikanz betrachtet wurden. In Abb. IV.14. und IV.15. sind Beispiele kleiner Alterationen dargestellt.

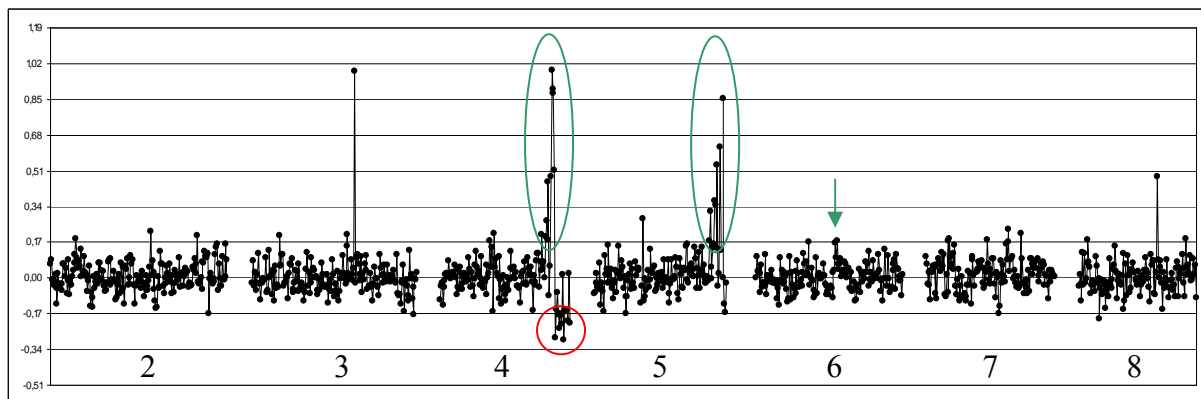
**Tab. IV.21.** Chromosomen (Chr.) mit detektierbaren Alterationen in den Array-Profilen je Fall und Angabe der probenabhängigen Schwellenwerte (SW) entsprechend der zweifachen Standardabweichung der  $\log_2$ -Ratios ( $2\sigma$ ). In den Spalten Zugewinne bzw. Verluste sind sämtliche Altrationen von mindestens zwei aufeinander folgenden BACs enthalten, wobei Zugewinne bzw. Verluste von mindestens drei konsekutiven BACs unterstrichen und partielle (part.) oder **ganzchromosomale Alterationen** in Fettdruck markiert sind.

Proben-Nr. (I131-Gabe)	SW	Anzahl veränderter BACs (in %)	Zugewinn mind. 2 BACs auf Chr.:	Verlust mind. 2 BACs auf Chr.:
593 opB [I <sup>131</sup> ]	0,317	123 (4,6%)	-	1, 10, 14, 17
598 opB [I <sup>131</sup> ]	0,241	131 (4,9%)	1, 2, 4, 6, 11, 18	-
592 SH [I <sup>131</sup> ]	0,193	132 (4,9%)	2, <u>4</u> , 6, 9, 10	-
86 NH [I <sup>131</sup> ]	0,184	122 (4,8%)	2	13
171 NH [I]	0,343	101 (3,8%)	3, 8	11, 17
582 NH [I <sup>131</sup> ]	0,438	100 (3,7%)	2	5, 8
778 NH [I <sup>131</sup> ]	0,486	113 (4,2%)	2, 2, 6, 7, 9, 9, 10, 11	6, 6
782 NH [I <sup>131</sup> ]	0,234	175 (6,5%)	8, 9, <u>17</u>	14
792 NH [I <sup>131</sup> ]	0,372	107 (4,0%)	<u>15</u>	8
795 NH [I <sup>131</sup> ]	0,209	167 (6,2%)	1, 7, 7, <u>10</u> , 10, 11	-
796 NH [I <sup>131</sup> ]	0,417	118 (4,4%)	-	1, 17, <b>4part</b>
1548 NH [I <sup>131</sup> ]	0,431	122 (4,5%)	1	17, <b>X</b>
1887 NH [I <sup>131</sup> ]	0,149	124 (4,7%)	11	13
1888 NH [I <sup>131</sup> ]	0,279	106 (3,9%)	8, 18, <b>X</b>	11
662 H NH [I <sup>131</sup> ]	0,427	126 (4,7%)	<u>4q</u> , <b>X</b>	<u>8</u> , 16
662 A FA [I <sup>131</sup> ]	0,168	86 (3,2%)	<u>4</u> , <u>5q</u> , 7	<u>4q</u>
798 s FA [I <sup>131</sup> ]	0,270	156 (5,8%)	3, 6, 10, 14	-
590 FK [I <sup>131</sup> ]	0,192	137 (5,4%)	1, <u>2</u> , 3, 6, 7, 7, <u>10</u> , 15	-
665 p FK [I <sup>131</sup> ]	0,214	150 (5,6%)	3, 7, 8, <b>15</b>	<b>4, 8part, 14</b>
665 s FK [I <sup>131</sup> ]	0,168	195 (7,2%)	<b>6</b>	<b>4, 5, 9</b>
669 FK [I <sup>131</sup> ]	0,090	127 (4,9%)	2	8, <b>4</b>
793 m FK [I <sup>131</sup> ]	0,266	127 (5,8%)	-	<u>4q</u> , <b>9, 14part</b>
793 s FK [I <sup>131</sup> ]	0,261	124 (4,6%)	6, 10, <u>17</u>	<b>4</b>
798 m FK [I <sup>131</sup> ]	0,267	166 (6,2%)	-	<b>4, 9q, 14</b>
961 FK [I]	0,144	157 (6,0%)	<u>5</u> , <u>7</u>	<b>4, 9</b>

#### IV. ERGEBNISSE



**Abb. IV.14.** Exemplarische Liniendiagramme für kleinen Zugewinn bzw. Verlust (y-Achsen-Skalierung:  $SW = 2 \sigma$ ): **A.** Da die Veränderung lediglich zwei konsekutive BAC-Klone umfasst, welche zudem nicht deutlich von der Streuung einzelner jenseits der Grenzwerte befindlicher BAC-Klone unterscheidbar ist, liegt hier keine „echte“ Amplifizierung vor. **B.** Amplifikation 3er konsekutiver BACs. **C.** Deletion 2er hintereinander liegender BACs.



**Abb. IV.15.** Liniendiagramm der Probe 662 FA [ $I^{131}$ ] (y-Achsen-Skalierung:  $SW = 0,17$ ), Chromosomen 2 bis 8: Deutliche lokale polyploide Amplifizierungen am q-Ende der Chromosomen 4 und 5 sind von den artifiziell erhöhten Werten einzelner BACs auf den Chromosomen 3 und 8 zu unterscheiden. Die Amplifizierung auf Chromosom 4 ist unmittelbar gefolgt von einem hemizygot deletierten Abschnitt. Eine sehr unauffällige Veränderung ist in Form einer Erhöhung 2er aufeinander folgender BACs oberhalb des SW auf Chromosom 6 lokalisiert (Pfeil).

## IV. ERGEBNISSE

### 4.3. Vorliegen von Veränderungen auf chromosomaler Ebene

Die Aneuploidie ist eine Genommutation, bei der einzelne Chromosomen zusätzlich zum üblichen Chromosomensatz vorhanden sind oder fehlen (vgl. Abschnitt III.6.5.2.). Die Untersuchung ergab, auf acht verschiedene Proben verteilt, das Vorhandensein von insgesamt zwölf Monosomien und drei Trisomien (Tab. IV.22.).

**Tab. IV.22.** Proben und Chromosomen (Chr.) mit Erfüllung der Kriterien für vorliegende Aneuploidien: Der erste Wert eines jeden Feldes entspricht dem Median (positiv bei Zugewinn und negativ bei Verlust; im Vergleich zum jeweiligen Schwellenwert [SW]), der zweite Wert dem prozentualen Anteil der in korrespondierender Richtung von Null abweichenden  $\log_2$ -Ratios (nur in Fällen mit Erfüllung des ersten Kriteriums angegeben). In zwei Fällen lag ein partieller Chromosomenverlust (part. Verlust, vgl. Abb. IV.13.A. und IV.16.D.) vor. Bei der Proben-Nr. 961\* handelte es sich um ein nicht Radiojod-behandeltes Kontrolltier.

Probe Chr.	662 NH	669 FK	793 m FK	793 s FK	961 FK*	665 s FK	665 p FK	798 m FK
4	-0,069	<b>-0,041</b> <b>81%</b> <b>Verlust</b>	-0,011	<b>-0,113</b> <b>81%</b> <b>Verlust</b>	<b>-0,076</b> <b>87%</b> <b>Verlust</b>	<b>-0,146</b> <b>92%</b> <b>Verlust</b>	<b>-0,108</b> <b>90%</b> <b>Verlust</b>	<b>-0,218</b> <b>88%</b> <b>Verlust</b>
5	-0,019	0,008	-0,006	0,017	0,006	<b>-0,108</b> <b>88%</b> <b>Verlust</b>	0,023	0,056
6	0,032	0,008	0,005	0,003	0,001	<b>0,121</b> <b>96%</b> <b>Gewinn</b>	0,014	0,012
9	-0,018	0,017	<b>-0,259</b> <b>88%</b> <b>Verlust</b>	<b>-0,076</b> <b>74%</b>	<b>-0,118</b> <b>88%</b> <b>Verlust</b>	<b>-0,144</b> <b>91%</b> <b>Verlust</b>	0,027	<b>-0,142</b> <b>78%</b> part. Verlust
14	-0,015	0,005	-0,059 71% part. Verlust	0,000	0,002	-0,001	<b>-0,099</b> <b>87%</b> <b>Verlust</b>	<b>-0,120</b> <b>88%</b> <b>Verlust</b>
15	-0,022	0,001	0,005	-0,005	0,008	0,012	<b>0,103</b> <b>86%</b> <b>Gewinn</b>	0,022
X	<b>0,236</b> <b>86%</b> <b>Gewinn</b>	0,004	-0,004	0,010	-0,011	0,006	0,013	-0,067
SW:	0,121	0,025	0,119	0,070	0,066	0,106	0,074	0,118

Zusammengefasst zeigten sich ganzchromosomale Verluste der Chromosomen 4, 9, 14 und 5, wobei das Vorkommen des letztgenannten Chromosom 5-Verlusts auf eine Probe beschränkt war. Die dazugehörigen Mittelwerte der  $\log_2$ -Ratios lagen zwischen -0,043 und -0,248. Trisomien konnten in zwei Proben desselben Falles (Nr. 665) einer bilateral karzinomatös veränderten Schilddrüse bezüglich der Chromosomen 6 bzw. 15 und in einer NH das X-Chromosom betreffend identifiziert werden, wobei die dazugehörigen Mittelwerte der  $\log_2$ -Ratios 0,119, 0,111 und 0,236 betrugen.

##### **4.4. Detektierte Alterationen in den CGH-Profilen**

Einer tabellarischen Übersicht (Tab. IV.23.) sämtlicher genomischer Alterationen ist zu entnehmen, dass wenige BAC-Klone umfassende „kleine“ Veränderungen auf Genebene (drei bis zehn betroffene BACs) bei allen Gruppen mit Ausnahme gesunder Schilddrüsen (opB) in geringer Anzahl vorzufinden waren. Das Ausmaß chromosomaler Imbalancen bezüglich Anzahl und Größe betroffener Regionen offenbarte eine deutliche Zunahme von SH und NH über FA zum FK: Die Hyperplasien zeigten Imbalancen (acht Loci bei 6/13 Hyperplasien; durchschnittlich 0,5 Loci pro NH) in unterschiedlicher Lokalisation von überwiegend kleiner (kleine Regionen umspannender) Ausdehnung. Eines der beiden FA war als einzige Läsion von polyploiden Amplifizierungen auf zwei Loci betroffen, wohingegen bei dem anderen FA keine genetischen Veränderungen nachweisbar vorhanden waren (drei Loci bei 1/2 FA; durchschnittlich 1,5 Loci pro FA). Die Karzinome wiederum fielen durch multiple Alterationen (durchschnittlich 2,5 Loci pro FK), hauptsächlich jedoch durch den hohen Anteil ganzchromosomaler Verluste oder Zugewinne auf.

Eine deutliche Assoziation bestand demnach zwischen malignen Tumoren und vorliegenden Aneuploidien (Monosomien bzw. Trisomien) inkl. partieller Chromosomenzugewinne bzw. Verluste. Während - abgesehen von der gonosomalen Alteration - bei nur einer nodulären Hyperplasie ein partieller Verlust des Chromosoms 4 vorlag (8 %) und gesunde Schilddrüsen sowie Adenome frei von aneuploiden Veränderungen waren (0 %), zeigten sieben von acht (88 %) Karzinomen Monosomien der Chromosomen 4, 5, 8 und/oder 14 oder Trisomien der Chromosomen 6 oder 15 (Tab. IV.23., Abb. IV.16.).

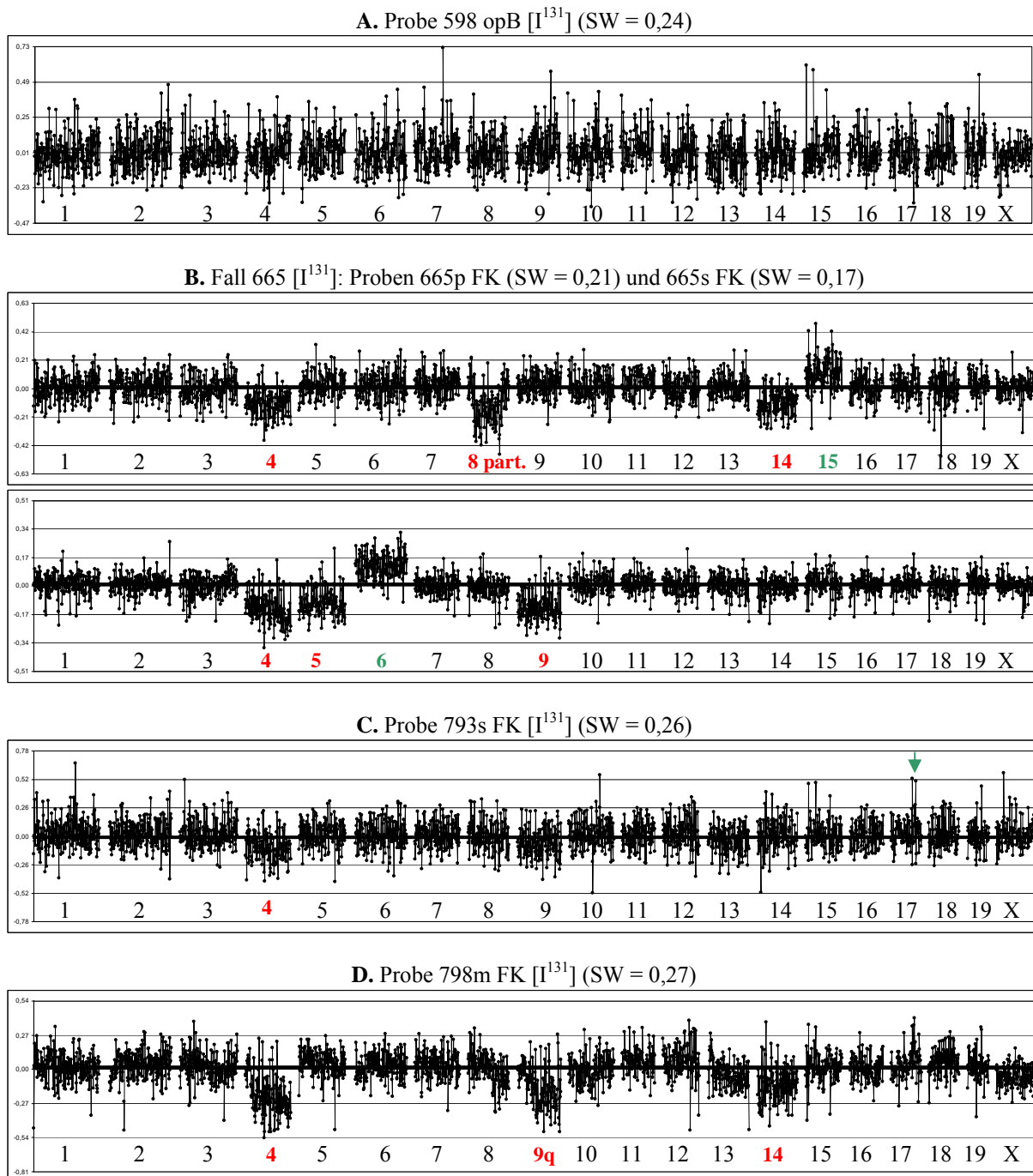
#### IV. ERGEBNISSE

**Tab. IV.23.** Lokalisation der Alterationen im CGH-Profil: Die ganzchromosomalen Alterationen (ohne Angabe der Lokalisation) sind gemeinsam mit partiellen (part.; mindestens die Hälfte eines Chromosom) und Alterationen kleiner DNA-Abschnitte dargestellt. Die Zugewinne bzw. Verluste weisen Veränderungen von mindestens drei konsekutiven BAC-Klonen auf (in Klammern die entsprechende Lokalisation in Mb). **Fettdruck** markiert die in mehr als einer Probe vorhandenen Veränderungen. Zur vergleichenden Betrachtung sind die korrespondierenden Diagramme (Abb.) bei den Proben angegeben.

Proben-Nr.		Zugewinne und Trisomien	Deletionen und Monosomien
593	opB	-	-
598	opB (Abb. IV.16.A)	-	-
592	SH (Abb. IV.14.B.)	4 (54,4-58,1)	-
86	NH	-	-
171*	NH	-	-
582	NH	-	-
778	NH	-	-
782	NH	17 (60,9-68,1)	-
792	NH	15 (25,2-29,2)	-
795	NH	10 (81,5-92,3)	-
796	NH	-	4part (0-118,6)
1548	NH	-	-
1887	NH	-	-
1888	NH (Abb. IV.14.C.)	-	-
662 H	NH	4q (126,1-140,7), X	8 (12-12,5)
662 A	FA (Abb. IV.15.)	4 (109,4-129), 5q (126-145,5)	4q (129,0-Ende)
798 s	FA	-	-
590	FK	2 (36,8-39,6)	-
665 p	FK (Abb. IV.16.B.)	15	<b>4</b> , 8part (12,5-108), <b>14</b>
665 s	FK (Abb. IV.16.B.)	6	<b>4</b> , <b>5</b> , <b>9</b>
669	FK	-	<b>4</b>
793 m	FK (Abb. IV.13.C.)	-	<b>4q</b> (125,5-Ende), <b>9</b> , <b>14part</b> (21,9-69,2)
793 s	FK (Abb. IV.16.C.)	17 (71,6-76,8)	<b>4</b>
798 m	FK (Abb. IV.16.D.)	-	<b>4</b> , <b>9q</b> (30-Ende), <b>14</b>
961*	FK	-	<b>4</b> , <b>9</b>

\*bei Proben-Nr. 171 und 961 handelte es sich um nicht Radiojod-behandelte Kontrolltiere

#### IV. ERGEBNISSE



**Abb. IV.16.** Exemplarische Liniendiagramme einiger Proben (Y-Achsen-Skalierung: Schwellenwert SW = 2  $\sigma$ ). Deletierte Chromosomen sind in roter Farbe beschriftet, amplifizierte in grün. **A.** Die gesunde Schilddrüse (opB) zeigt trotz vereinzelter „Ausreißer“ keine Veränderungen (vgl. auch Abb. IV.15.A.). **B.** Neben gemeinsam vorhandener Chromosom 4-Deletion zeigen beide Läsionen des Falles 665p (papilläres FK und solides FK) multiple Chromosomenzahlaberrationen. **C.** Der Verlust von Chromosom 4 ist von einer Amplifizierung 3er konsekutiver BACs auf Chromosom 17 begleitet (Pfeil). **D.** Im Vergleich zu den Verlusten der Chromosomen 4 und 14 handelt es sich bei Chromosom 9 um einen partiellen Verlust unter Erhalt eines kleinen p-seitigen Chromosomenabschnittes.

### **4.5. Vergleich der CGH-Profile aller Proben**

Bei gemeinsamer Betrachtung der CGH-Profile waren gleichartige Veränderungen, d. h. gemeinsam überlappende Regionen (*minimal common region*, MCR), welche in mindestens 20 % der Fälle einer Untersuchungsgruppe (SH, NH, FA oder FK) auftraten, von signifikanter Bedeutung und galten als hinweisend auf dort möglicherweise lokalisierte Kandidatengene mit karzinogenetischer Bedeutung.

#### 4.5.1. Deletionen und Monosomien

In der überwiegenden Zahl der Deletionen enthaltenden Schilddrüsenveränderungen handelte es sich um Karzinome. Die Chromosomen 4 (sieben Karzinome [88 %]), 9 (vier Karzinome [50 %]) und 14 (drei Karzinome [38 %]) waren hierbei auffallend häufig von ganzchromosomalem und partiellem Verlust betroffen (Tab. IV.22.).

Monosomie des **Chromosoms 4** war im Array-Profil von insgesamt sechs der acht (75 %) Schilddrüsenkarzinom-Proben nachzuweisen. Zudem zeigten eine NH (Nr. 796) einen partiellen Verlust von 0 bis 118,6 Mb, sowie ein FA (Nr. 662 A, ab 129,0 Mb) und ein weiteres FK (793m, ab 125,5 Mb) einen Verlust am q-Ende (vgl. Tab. IV.24.). Die Deletionen der Karzinome ergänzen sich zu einer MCR von 125,5 Mb bis zum q-Ende.

Eine komplette Deletion des **Chromosoms 9** war in drei (38 %) verschiedenen Proben mit Karzinom zu ermitteln. Bei einem weiteren Karzinom handelte es sich um einen partiellen Verlust des q-Endes ab 30,0 Mb, so dass die MCR dieser vier (50 %) Karzinome dem des letztgenannten Falles entspricht (Tab. IV.24.). Zusätzlich lag bei der Probe 793s FK eine leichte (nicht signifikante) ganzchromosomale Verschiebung nach unten vor (s. Tab IV.22.).

Da bei zwei (25 %) Karzinomen ein kompletter **Chromosom 14**-Verlust und bei einem malignen Tumor ein partieller Verlust zu erkennen waren, reichte die MCR von 21, 9 bis 69,2 Mb (Tab. IV.24.).

Zusätzlich waren bei einem der Karzinome (13 %) ein **Chromosom 5**-Verlust und bei einem anderen FK eine partielle Deletion des **Chromosoms 8** (12,5 bis 108 Mb) vorhanden, welche jedoch keine Überlappung mit dem deletierten Bereich dreier konsekutiver BACs einer NH auf demselben Chromosom (12,0-12,5 Mb) zeigte (Tab. IV.23.).



#### IV. ERGEBNISSE

**Tab. IV.24.** Chromosomen mit Verlusten: Ausdehnung der Deletion je Probe und kleinste gemeinsame Region (MCR, *Minimal common region*):

Chr. (Anzahl BACs)	Tumoren (% mit Deletion)	Proben-Nr.	Lokalisation der Deletion in Mb (Anzahl betroffener BAC-Klone)	MCR [Mb]
4 (119)	NH (12 %)	796 [I <sup>131</sup> ]	0 - 118,6 (119 BACs)	-
	FA (50 %)	662 A [I <sup>131</sup> ]	129,0 - Ende (17 BACs)	-
	FK (88 %)	665 s [I <sup>131</sup> ]	Monosomie	125,5 - Ende
		665 p [I <sup>131</sup> ]	Monosomie	
		669 [I <sup>131</sup> ]	Monosomie	
		793 m [I <sup>131</sup> ]	125,5 - Ende (11 BACs)	
		793 s [I <sup>131</sup> ]	Monosomie	
		798 m [I <sup>131</sup> ]	Monosomie	
		961 [I]	Monosomie	
5	FK (13 %)	665 s [I <sup>131</sup> ]	Monosomie	-
9 (140)	FK (50 %)	665 s [I <sup>131</sup> ]	Monosomie	30,0 - Ende
		793 m [I <sup>131</sup> ]	Monosomie	
		798 m [I <sup>131</sup> ]	30,0 - Ende (112 BACs)	
		961 [I]	Monosomie	
14 (127)	FK (38 %)	665 p [I <sup>131</sup> ]	Monosomie	21,9 - 69,2
		793 m [I <sup>131</sup> ]	21,9 - 69,2 (47 BACs)	
		798 m [I <sup>131</sup> ]	Monosomie	

#### 4.5.2. Amplifizierungen und Polyploidien (Trisomien)

Die einzige bei der SH (Nr. 592) auftretende Alteration auf Chr. 4 zeigte ebenso wie alle übrigen „kleinen“ Amplifizierungen bei den NH auf den Chr. 4, 10, 15 und 17 und den FK auf den Chromosomen 2 und 17 (Tab. IV.23.) keinerlei Gemeinsamkeit mit anderen Proben.

Bei einem der beiden FA waren zwei auf den Chromosomen 4 und 5 lokalisierte regionale Amplifizierungen erkennbar, welche im Unterschied zu allen sonstigen triploiden Alterationen im polyploiden Bereich anzusiedeln waren.

Die triploiden Chromosomen 6, 15 und X wurden jeweils nur bei einer Probe vorgefunden (Nr. 665s FK, 665p FK und 662 NH) und waren im Falle der Karzinome von multiplen Deletionen anderer Chromosomen begleitet (Tab. IV.23.).

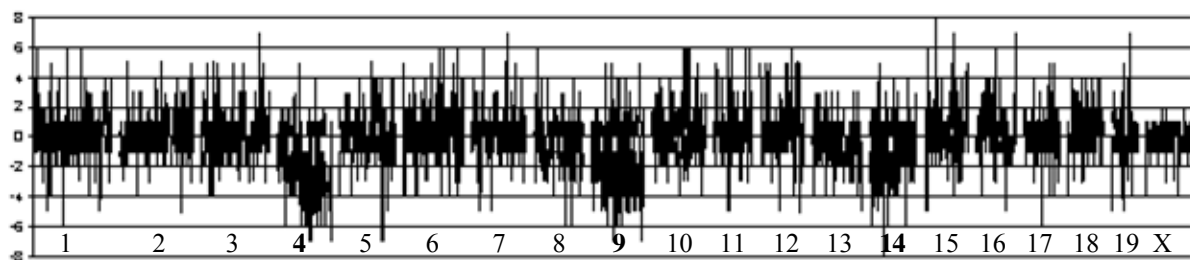
#### **4.6. CGH-Profil der FK in Zusammenhang mit verschiedenen Parametern**

Der Umfang ermittelter Alterationen in der Gruppe der Karzinome wich - wie vorausgehenden Abschnitten zu entnehmen - deutlich von dem der anderen histologischen Untersuchungsgruppen ab. Zugleich sind die Veränderungen sämtlicher Karzinome jedoch von großer Similarität geprägt (Abb. IV.17.).

#### IV. ERGEBNISSE

Die Tumoren zeigten mit Ausnahme eines überwiegend papillär wachsenden Tumors (665p) und eines Tumors mit makrofollikulärer Tendenz (793m) solides bis mikrofollikuläres Wachstum. Ein Zusammenhang zwischen Wachstumsmuster und Art der chromosomalen Veränderung lag nicht vor.

Die betroffenen genomischen Lokalisationen des einzigen Kontrolltieres mit spontanem Karzinom zeigten keine deutliche Abweichung von denen der Radiojod-behandelten Tiere (Tab. IV.25.). Bei einem Vergleich zwischen den Mäusen mit J6F2- und JHF2-Hintergrund ließ sich beobachten, dass trisomische Chromosomenzahlaberrationen und Verluste der Chromosomen 5 und 8 ausschließlich bei letztgenannter Gruppe vorlagen. Eine statistische Auswertung ist ob des geringen Probenumfanges obsolet (Tab. IV.25.).



**Abb. IV. 17.** In dem Liniendiagramm sind die BAC-Klone in der Reihenfolge ihrer Lokalisation gegen die Anzahl der Karzinome (n = 8) aufgetragen, bei welchen die BAC-Klone eine Deletion (- n) oder Amplifizierung (+ n) aufwiesen (y-Achsen-Skalierung = 2): Das gehäufte Auftreten von Deletionen der Chromosomen 4, 9 und 14 ist in gemeinsamer Darstellung deutlich ersichtlich.

**Tab. IV.25.** Tabellarische Übersicht über die vorhandenen genetischen Alterationen in Abhängigkeit von genetischem Hintergrund und Radiojod-Applikation:

Mauslinie	J6F2						JHF2	
Radiojod-Gabe	Kontrolltier	I131-Gruppe					I131-Gruppe	
Proben-Nr.	961	590	669	793 m	793 s	798 m	665 p	665 s
Chr.-4-Monosomie	M		M	q-V	M	M	M	M
Chr.-5-Monosomie								M
Chr.-8-Monosomie							part. V	
Chr.-9-Monosomie	M			M		q-V		M
Chr.-14-Monosomie				part. V		M	M	
Trisomie							Chr. 15	Chr. 6
kleine Zugewinne	5, 7	2, 10			17			

Legende: M = Monosomie, part. V = partieller Verlust, q-V = Verlust am q-Ende, Chr. = Chromosom

**V. DISKUSSION**

Ziel der Studie war es, ein Mausmodell für Schilddrüsentumoren zu untersuchen, welches die Möglichkeit in sich birgt, anhand weiterführender molekulargenetischer Studien zu einem verbesserten Verständnis der an strahleninduzierter Schilddrüsenkarzinogenese beteiligten Mechanismen zu führen, und dieses auf Basis einer standardisierten histologischen Klassifizierung zu etablieren. Hierbei dienten die histologischen und molekularen Erkenntnisse aus der Humanpathologie bezüglich strahlenassoziierter Entstehung von Schilddrüsentumoren als Anhaltspunkte bzw. Vergleich, die überwiegend aus den Folgen des Reaktorunglückes von Tschernobyl 1986 gewonnen wurden.

Aufgrund der kurzen Expositionszeit (acht Tage HWZ von Radiojod) der Tschernobyl-Opfer, stellen die mit dem Reaktorunglück assoziierten Schilddrüsentumoren ein unvergleichlich homogenes Probenmaterial dar, um die strahlenassoziierte Schilddrüsenkarzinogenese bezüglich Morphologie, Molekularbiologie und klinischem Verlauf beim Menschen direkt untersuchen zu können (Williams *et al.*, 2004). Da jedoch, insbesondere im Dosisbereich mit schwächer ausgeprägten biologischen Effekten, zahlreiche Störfaktoren, wie unterschiedliche individuelle Radiosensitivität, Interaktion mit anderen Mutagenen und die Lebensart, Einfluss nehmen können, kann diese Variabilität durch den Ansatz im Mausexperiment mit einer hohen Anzahl gleichartiger Individuen und Lebensbedingungen minimiert werden (Maddison und Clarke, 2005).

Bei Planung des hier ausgewerteten Tierexperiments wurden die Erkenntnisse in Zusammenhang mit dem Reaktorunglück zugrunde gelegt. Demzufolge wurde das Radiojod-Isotop  $I^{131}$ , welches im Wesentlichen mit dem Auftreten der Schilddrüsenkarzinome in den radioaktiv kontaminierten Regionen in Weißrussland in Verbindung gebracht wird, zur Tumorinduktion appliziert. Die Tschernobyl-assoziierte Schilddrüsentumorinzidenz zeigte eine negative Korrelation zum Alter der Menschen bei Exposition und ein gehäuftes Auftreten der Tumoren bei Kindern. Da darüber hinaus aus älteren tierexperimentellen Studien hervorging, dass bei der Maus eine ausschließlich durch Radiojod vermittelte Tumorinduktion nur beim Fetus oder Neugeborenen erfolgreich ist, wurde das  $I^{131}$  den Muttermäusen während Gravidität und Laktation zum Zwecke der Weitergabe an die Nachkommen intraperitoneal appliziert. Die parallele Fütterung mit einer Jodmangeldiät diente hierbei der Förderung der Aufnahme der Radionuklide durch die Thyreozyten. Auch in den kontaminierten Regionen von Tschernobyl lag eine unterschwellige Jodmangelsituation vor, deren karzinogenetische Bedeutung bislang nicht eindeutig geklärt ist (Williams, 2002).

Die Verwendung unterschiedlicher F1- und F2-Hybridkreuzungen sollte dem Erkennen einer möglicherweise vorhandenen genetischen Prädisposition dienen. Ein großer Probenumfang neoplastischer Läsionen war aufgrund der in der Literatur beschriebenen Mausexperimente nicht zu erwarten (Walinder und Sjöden, 1971). Bei separater Betrachtung verschiedener Parameter (Mauslinie, Geschlecht, Alter) waren bedingt durch die große Heterogenität der einzelnen Untersuchungsgruppen mit geringer Tierzahl dementsprechend auch nur tendenziell Unterschiede erkennbar. Daher waren die Möglichkeiten zur Gewinnung detaillierter Erkenntnisse bezüglich genetischer Prädisposition eingeschränkt.

### **1. Histologie**

Karzinogenetische Studien anhand von Mausmodellen erfordern zwingend die Etablierung standardisierter muriner Klassifizierungsschemata mit präziser Definition und konstanter Nomenklatur der verschiedenen hyper- und neoplastischen Veränderungen, um eine Vergleichbarkeit von humanen und murinen Tumoren und insbesondere von verschiedenen Studien zu gewährleisten, sowie neue Mausmutanten folgerichtig einzuordnen. Bezüglich anderer Organe sind bereits einige Veröffentlichungen zu finden, in welchen Vorschläge zu Klassifizierung muriner Tumoren in Anlehnung an die Humanpathologie erarbeitet wurden (z. B. Nikitin *et al.*, 2004; Morse *et al.*, 2002). Zur Standardisierung eines Schilddrüsentumor-Phänotyps wurden somit im Sinne der interdisziplinären komparativen Pathologie bei der Diagnostik der murinen Schilddrüsenläsionen die Klassifizierungskriterien und die Nomenklatur der Humanpathologie zu Grunde gelegt (WHO, 2004; Rosai, 2004).

In der Mauspathologie herrscht eine vielfach zitierte „willkürliche“ (Frith und Heath, 1984) und uneinheitliche Klassifizierung der Schilddrüsentumoren vor, welche auf mangelhafte Abgrenzbarkeit der verschiedenen „Stadien“ (bei Progression von Hyperplasie über Adenom zu Karzinom) zurückgeführt wird (Boorman, 1997). Darüber hinaus gilt eine unzureichende Korrelation der anhand morphologischer Kriterien gestellten Diagnose mit dem biologischen Verhalten der Tumoren als belegt, so dass beispielsweise histologisch von Todd (1986) als maligne beurteilte Tumoren bei Ratten bzw. von Thomas *et al.* (1991) bei der Maus durch Absetzen des stimulierenden Agens Reversibilität zeigten.

Eine grundlegende Problematik besteht weiterhin darin, dass in der Mauspathologie in der Regel von der Humanpathologie abweichende Schemata zur Klassifizierung angewandt werden (vgl. Abschnitt II.2.1.). Bei fehlender Übereinstimmung der diagnostischen Kriterien stellt sich somit die Frage, ob dafür primär die unterschiedliche Betrachtungsweise ein- und

derselben Läsion oder primär eine speziesbedingte unterschiedliche Tumormorphologie ursächlich verantwortlich ist.

### 1.1. Histologische Klassifizierung der murinen Schilddrüsentumoren

Die Vielfalt an **Subtypen** (Varianten) humaner Tumoren stellt ein im Vergleich zu den murinen Klassifizierungsschemata auffallendes Merkmal der humanpathologischen Schilddrüsendiagnostik dar. In vorausgehenden Studien hatte sich gezeigt, dass die äquivalente Übertragung humanpathologischer Kriterien auf die Maus zu diagnostischer Konfusion führen kann: Insbesondere bei Anwendung spezifischer humanpathologischer Termini (wie *Lindsay's Tumor*, Hürthle-Zell-Tumor) zeigte sich trotz morphologischer Ähnlichkeit eine mangelhafte Übereinstimmung bezüglich biologischem Verhalten (Frith und Heath, 1984). Bei vorliegender Arbeit fand demzufolge eine der Humanpathologie entlehnte Nomenklatur ausschließlich dann Anwendung, wenn eine eindeutige Übereinstimmung der genannten Kriterien vorlag. Dadurch war unter Verzicht auf eine Benennung von Tumorsubtypen eine Anwendung der humanen WHO-Klassifizierung prinzipiell möglich. Eine weitere Unterteilung der Tumoren wurde auf deskriptive Merkmale (Wachstumsmuster, Ausmaß der Kapselbildung und Anzahl vorhandener Läsionen) beschränkt, da beispielsweise die solide wachsenden Tumoren keine Ähnlichkeit mit den humanen Hürthle-Zell-Tumoren zeigten und lediglich bei einem follikulären Karzinom die Diagnosestellung einer *clear-cell* Variante in Betracht kam (vgl. Abb. IV.4.E.).

Konsequenterweise sind bei Zugrundelegung der humanen Klassifizierungskriterien dieselben morphologisch intermediären Formen proliferativer Veränderungen zu beobachten, welche auch in verschiedensten Artikeln über humane Schilddrüsentumoren beschrieben sind (Williams, 2000). Zu diesen - in der Humanpathologie seltenen - Grenzfällen sind **gutartige Knoten** zu zählen, welche teilweise übereinstimmende Merkmale mit einer nodulären Hyperplasie (NH: z. B. Multinodularität) und zusätzlich Charakteristika eines follikulären Adenoms (FA: z.B. Kapsel, Kompression, Uniformität) aufweisen. Auf histomorphologischer Ebene ist in solchen Fällen eine eindeutige Differenzierung zwischen Knoten einer NH und einem FA weder nach humaner noch nach muriner Klassifizierung zweifelsfrei möglich, da nicht definiert ist, welche der formulierten Kriterien von über- oder untergeordneter Bedeutung sind (Hirokawa *et al.*, 2002). Allgemein gilt, dass Adenome aus einer monoklonalen Zellpopulation bestehen (Thomas *et al.*, 1989). Verschiedentlich durchgeführte Klonalitätsstudien bei gutartigen Knoten beim Menschen belegen die Problematik der

## V. DISKUSSION

histologischen Diagnosestellung (Rosai, 2004): Es stellte sich heraus, dass ein signifikanter Anteil morphologisch den Adenomen zugeordneter Veränderungen polyklonal, und, mit noch deutlicherer Signifikanz (bis zu 66 %), „dominante“ Knoten von multinodulären Hyperplasien monoklonal in Erscheinung treten (Apel *et al.*, 1995; Chung *et al.*, 1999; Harrer *et al.*, 1998). Bei der hier durchgeführten histologischen Klassifizierung wurden fünf FA gemeinsam mit einer NH und zwei multiple FA diagnostiziert. Multiple Nodularität galt somit nicht als ein das Adenom ausschließendes Kriterium und geht konform mit den Beobachtungen zahlreicher Autoren, denen zufolge bei der Maus diskrete Adenome innerhalb hyperplastisch veränderter Schilddrüsen entstehen können (Boorman, 1999; Frith und Heath, 1984; Jokinen und Botts, 1994). Eine vollständige Abkapselung wurde bei vorliegender Untersuchung als entscheidendes diagnostisches Merkmal hinzugezogen (WHO, 2004), obwohl diesem Kriterium in der Mauspathologie im Allgemeinen eine nur untergeordnete Bedeutung beigemessen wird. Die Kapselbildung zeigte jedoch eine gute Korrelation mit gleichzeitigem Vorhandensein weiterer FA-Charakteristika, insbesondere Kompression und zytoarchitektonischer Uniformität.

Bei vorliegender Untersuchung waren in der Gruppe der NH teilweise Veränderungen enthalten, welche nach muriner Klassifizierung aufgrund ihrer „zytoarchitektonischen Komplexität“ den Neoplasien zugeordnet würden. „Komplexes“ papilläres Wachstum ist in der Mauspathologie definiert als fortgeschrittene papilläre Einstülpungen des Follikelepithels, welche im Falle eines bei der Maus häufig diagnostizierten **„papillären Adenoms“** das Lumen infolge zunehmender Größe und höheren Verzweigungsgrades nahezu komplett ausfüllen (Frith und Heath, 1984; Walinder und Sjödn, 1971 und 1972). Diese Formulierung ist unvereinbar mit der beim Menschen nicht existenten unmittelbaren Progression einer NH zum FA. Des Weiteren wird bei der Maus keine Differenzierung zwischen echten und Pseudopapillen (papillomatöse Solidifikation mit und ohne fibrovaskulärem Grundstock) vorgenommen (Capen, 2001). Bei vorliegender Arbeit hingegen wurde in Anlehnung an die Humanpathologie der Begriff „echte Papille“ für malignes Wachstum reserviert und benignes papilläres Wachstum ausschließlich als „pseudopapillär“ bezeichnet. Ein gegebenenfalls vorhandener bindegewebiger Grundstock war jedoch bei den untersuchten Mäusen stets nur sehr schwach ausgebildet. Das Ausmaß der pseudopapillären Protrusionen wurde als fortschreitendes hyperplastisches Wachstum interpretiert und war kein Unterscheidungsmerkmal zwischen NH und FA. Vielmehr dienten ausschließlich die in der Humanpathologie formulierten FA-Charakteristika einer diagnostischen Zuordnung, so dass bei pseudopapillärem Wachstum eines solitären abgekapselten Tumors mit gleichförmiger

## V. DISKUSSION

Zytomorphologie die Diagnose einer FA-PV (papilläre Variante eines FA) zu stellen war. Adenomatöse Charakteristika wurden jedoch bei keinem potentiellen „papillären FA“ beobachtet.

Im Rahmen dieser Arbeit war eine große Heterogenität der hyperplastischen Noduli zu beobachten. Zahlreiche Knoten wiesen zelluläre **Atypien** und ein **pleomorphes Zellbild** auf, obwohl diese in der Mauspathologie in der Regel mit maligner Entartung der Zellen in Verbindung gebracht und als essentielles Diagnosekriterium für kontinuierliche Entwicklung von Hyperplasie über Adenom zum Karzinom herangezogen werden (Capen, 2001) und demnach Uniformität als Charakteristikum für Hyperplasien gilt (Boorman, 1997). Aus der Humanpathologie jedoch ist bekannt, dass hyperplastische Veränderungen - insbesondere bei anamnestischer Strahlenexposition - zahlreiche morphologische Merkmale eines malignen Tumors aufweisen können (WHO, 2004; Rosai, 2004). Analog zur humanpathologischen Klassifizierung waren die in dieser Studie diagnostizierten (typischen) FA daher durch Uniformität gekennzeichnet.

In der humanen Schilddrüsenpathologie steht die **mitotische Aktivität** eines gut differenzierten follikulären Tumors in guter Korrelation zu invasivem oder metastasierendem Verhalten (WHO, 2004). Auch in dieser Studie war in sämtlichen invasiven Neoplasien eine deutlich vermehrte Anzahl mitotischer Figuren nachweislich vorhanden. Demgemäß gehört die mitotische Aktivität zu den herausragenden und diagnostisch relevanten Malignitätsmerkmalen eines murinen gut differenzierten Karzinoms (FK). Dies konnte mittels immunhistochemischen Nachweises der Proliferation (Ki67) verifiziert werden (Schlüter *et al.*, 1993; Ludvikova *et al.*, 2005). Im Rahmen der humanen Schilddrüsendiagnostik werden Überschneidungen der Färbeindizes von Tumorgruppen und die Heterogenität der Färbung innerhalb der Tumoren als limitierende Faktoren dargestellt (Mehrotra *et al.*, 2006). Bei vorliegender Untersuchung demonstrierte Ki67-Positivität jedoch eine gute Korrelation zu malignem invasivem Verhalten. Die erhöhte Proliferationsrate trat erwartungsgemäß am stärksten in der Peripherie der Tumoren auf.

Drei Adenome (20 %) der I<sup>131</sup>-Gruppewurden als **atypische FA** klassifiziert. Es handelte sich um solide Tumoren, bei welchen neben nukleären Atypien und Pleomorphismus auch eine erhöhte Mitoserate vorlag, wohingegen invasives Verhalten anhand der vorhandenen Schnitte nicht nachweisbar war. Ein atypisches FA zeigte eine zwischen den benignen Noduli und den FK liegende mitotische Aktivität, was dessen intermediären Charakter unterstreicht. Da vermehrte Proliferation jedoch zu den allgemeinen Merkmalen maligner Tumoren in Abgrenzung zum FA gehört und überdies invasives Verhalten mangels Serienschnitten nicht

## V. DISKUSSION

definitiv ausgeschlossen werden kann (Schmid und Farid, 2006), ist eine Umbenennung der atypischen FA zum FK denkbar.

Demnach galt - analog zum Menschen - das nachweislich vorhandene **invasive Verhalten** der Tumorzellen als das entscheidende Kriterium für die Abgrenzung eines FK von einem gutartigen (atypischen) FA. Hierbei waren die in der Humanpathologie präzise formulierten Kriterien für kapsuläre oder vaskuläre Invasivität (WHO, 2004) insgesamt weniger streng einzuhalten und in Begleitung mit erhöhter Mitoserate und gegebenenfalls vorhandenen zellulären und nukleären Atypien für die Diagnose eines malignen Tumors ausreichend. Eine offensichtliche Infiltration von Tumorzellen in die nicht notwendigerweise unterbrochene Kapsel war von hinreichender Signifikanz, obwohl in der humanen Diagnostik ein vollständiger Kapseldurchbruch vorliegen muss. Diese Differenz in der Beurteilung war in der Tatsache begründet, dass es im Zweifelsfall zur endgültige Beurteilung der Invasivität erforderlich wäre, infiltratives Verhalten anhand von Serienschnitten definitiv auszuschließen (Schmid und Farid, 2006), was infolge der verminderten morphologischen Qualität der für die Mikrodissektion präparierten Gewebeschnitte nur begrenzt möglich war. Die Gefäßinvasion war analog zur Humanpathologie anhand von intravaskulären Tumorzellen mit Kontakt zum Gefäßendothel (zur Differenzierung von artifizieller Einschwemmung bei der Präparatherstellung) großkalibriger Gefäße in oder neben der Kapsel erkennbar. Im Gegensatz zur vorliegenden Untersuchung erfolgt zur Diagnoseabsicherung bei humanen Patienten, neben Nachweis eines begleitenden Thrombus oder Endothelüberzugs der Tumorzellen, häufig zusätzlich eine immunhistochemische Bestätigung der Gefäßinvasion (z. B. CD34).

Die angewandte Zuordnung der Läsionen zeigte sich mit dem Ausmaß molekulargenetischer Veränderungen bestätigt (s. u.), wohingegen das Fehlen jeglichen **metastatischen Tumorwachstums** in makroskopisch erkennbarem Umfang belegt, dass maligne gut differenzierte Schilddrüsentumoren der Maus eine im Vergleich zum Menschen (max. 25 %) noch geringere Metastasierungsneigung besitzen. In der Literatur ist eine Metastasierung muriner Schilddrüsentumoren nahezu ausschließlich bei undifferenzierten Karzinomen beschrieben (z.B. Powell *et al.*, 2001; La Perle *et al.*, 2000; Ledent *et al.*, 1995). Eine der Humanpathologie entsprechende Unterscheidung zwischen minimal- und hoch-invasivem FK war bei der Maus obsolet, da eine Korrelation unterschiedlicher Grade lokaler Invasion mit der Metastasierungshäufigkeit bei fehlendem Nachweis von Metastasen nicht ermittelt werden konnte.



### 1.2. Tumorzinzidenz und Tumorentstehung

Die **Tumorzinzidenz** bei den Radiojod-behandelten Mäusen fiel in der vorliegenden Studie mit einem Anteil von 12,8 % (7,4 % FA und 5,4 % FK) relativ niedrig aus (vgl. Abschnitt IV.1.2.). Das relative Risiko (RR) für Karzinomentstehung lag bei 9,0 (d. h. ein neunfach erhöhtes Risiko bei Strahlenexposition). Demgegenüber erreichte das RR für die Entstehung von Schilddrüsenkarzinomen beim Menschen in durch das Reaktorunglück von Tschernobyl stark von radioaktivem Fallout kontaminierten Regionen in Weißrussland bei einer Exposition im Alter von unter einem Jahr Werte von bis zu 237 (WHO, 2004). Ob die Maus eine im Vergleich zum Menschen geringere Suszeptibilität für strahleninduzierte Schilddrüsentumoren aufweist, lässt sich hieraus jedoch nicht folgern, da eine unmittelbare Entsprechung von Jodversorgungsstatus und Dosis nicht gegeben ist (Robbins *et al.*, 2001): Die geschätzte mittlere Dosis in der Schilddrüse von Tschernobyl-Opfern liegt zwischen 0,01 und 3,1 Gy und kann individuell in Abhängigkeit von zahlreichen Faktoren mehr als das Zehnfache betragen (Cardis *et al.*, 2006).

Begründet in der Annahme, dass bei der Maus eine im Gegensatz zur Ratte geringere Erfolgsrate bei experimenteller Schilddrüsentumorinduktion zu erwarten ist (Boltze *et al.*, 2002; Foster, 1982), finden sich in der Literatur nur wenige vergleichbare Studien bei der Maus (Abschnitt II.1.5.3.2.). Die Häufigkeit und Verteilung der Radiojod-induzierten Tumoren der vorliegenden Arbeit (7 % FA, 5 % FK) zeigte allerdings eine gute Übereinstimmung mit den in ähnlich durchgeführten Versuchen von Walinder und Sjöden (1972, 1973) ermittelten Ergebnissen (Adenome 6-22 %, Karzinome 0,4-5,6 % je nach Dosis). In Abwandlung zu genanntem Experiment erfolgte bei vorliegender Studie eine wiederholte Radiojodapplikation sowie eine Boosterung mittels nutritiven Jodmangels. Unter Annahme äquivalenter Klassifizierungsschemata, scheint hierdurch im Verhältnis FK zu FA eine Verschiebung zu Gunsten maligner Tumore vorzuliegen.

Bei einem tierexperimentellen Ansatz ist darüber hinaus zu berücksichtigen, dass eine Reduktion der Variabilität (Störfaktoren) im Kontrast zu der Vielzahl einwirkender äußerer und innerer (individueller) Faktoren bei Tschernobyl-assoziierten Schilddrüsenkarzinogenese steht (Rangarajan und Weinberg, 2003). Möglicherweise ist die niedrige Inzidenz demnach auf das Fehlen sonstiger, wesentlich an der Tumorentstehung beteiligter Faktoren zurückzuführen. Unter anderem wird neben Radiojod eine Beteiligung weiterer Radionuklide bei Tschernobyl-assoziierten Fällen angenommen (Cardis *et al.*, 2006; Finn *et al.*, 2004). Eine Erhöhung der Radiojod-Dosis hingegen würde vermutlich den Umfang von auf

## V. DISKUSSION

Strahlungsschädigung zurückzuführenden neoplastischen Erkrankungen nicht erhöhen, sondern vielmehr zur Destruktion von Thyreozyten (WHO, 2004; Walinder, 1972; Boltze, 2002) bis hin zu einer kompletten Zerstörung des Drüsengewebes führen (Jokinen und Botts, 1994). Zudem zeigte sich laut Walinder und Sjöden (1973) eine primäre Korrelation der Dosis mit der Latenzzeit anstatt der Inzidenz. Eine vermutete höhere Suszeptibilität (mit zwei- bis vierfach erhöhter Inzidenz) der Nagetier-Schilddrüse gegenüber externer Röntgenbestrahlung im Vergleich zu interner Radiojodexposition (Doniach, 1963; Walinder, 1971) wurde in Folgestudien widerlegt (Lee *et al.*, 1982, Walinder und Sjöden, 1973).

Bei vorliegender Studie wurden unter den Kontrolltieren je ein (0,6 %) FA und ein (0,6 %) FK bei Mäusen im Alter von etwa 470 Tagen diagnostiziert. Die Inzidenz dieser **spontanen Tumoren** korreliert mit den zuvor in der Literatur beschriebenen Daten (vgl. Abschnitt II.1.5.3.1.). Gleichzeitig ist ein möglicher Zusammenhang mit der zugeführten Jodmangeldiät bei den Kontrolltieren nicht auszuschließen.

In der Gruppe der Radiojod-behandelten Mäuse war ein signifikant erhöhtes Auftreten **hyperplastischer Schilddrüsenerkrankungen** nachzuweisen (Abschnitt IV.1.1.3.). Neben den isoliert diagnostizierten SH (24 %) und NH (20 %) waren bei 31 % der FA und bei 82 % der FK gleichzeitig hyperplastische Veränderungen vorhanden. In vergleichbaren Studien von Walinder und Sjöden (1971, 1972, 1973) sind ausgeprägte hyperplastische Veränderungen der Mäuse ebenfalls beschrieben. Ebenso liegen bei humanen Tschernobyl-assoziierten Schilddrüsenkarzinomen häufig gleichzeitig nicht-neoplastische Schilddrüsenerkrankungen vor (Rybakov *et al.*, 2000), wohingegen das umgebende Schilddrüsengewebe von nicht mit Strahlungsexposition in Verbindung gebrachten Tumoren in der Regel unverändert ist. Hiermit stellt sich die Frage nach der Ätiopathogenese der zahlreichen hyperplastischen Veränderungen. Gleichzeitig wird ein zur direkten Strahleninduktion alternativer Weg der Tumorentstehung evident. Für das Auftreten der Hyperplasien sind verschiedene ursächliche Faktoren in Betracht zu ziehen:

In erster Linie liegt die Vermutung nahe, dass das Radiojod bei einigen Mäusen eine durch letale Genomschädigung verursachte Destruktion der Thyreozyten anstelle einer direkt karzinogenetischen Wirkung zu Folge hatte (WHO, 2004). Je nach Lokalisation, Art und Umfang der Genom-Schädigung kann es bei gleicher Strahlendosis in verschiedenen Zellen alternativ zu Zelltod, DNA-Reparatur oder Tumorinduktion kommen (Sarasin *et al.*, 1999). Mit großer Wahrscheinlichkeit handelt es sich somit bei einem Teil der diagnostizierten NH um eine kompensatorische Neubildung (Regeneration) des durch radioaktiven Jod<sup>131</sup>-Zerfall zerstörten Parenchyms, welche infolge der reduzierten T3-/T4-Bildung über den TRH-TSH-

## V. DISKUSSION

Rückkopplungsmechanismus induziert wird (vgl. Abschnitt II.1.3.). Im Rahmen eines vor Beginn dieser Studie durchgeführten Vorversuches zur Determinierung des Versuchsendes wurden die Schilddrüsen von Radiojod-behandelten Mäusen jüngeren Alters histologisch untersucht und verifizierten diese Hypothese: Bei den meisten Jungtieren war eine hochgradige degenerative Atrophie zu erkennen. Zu unterscheiden ist die primär strahleninduzierte Destruktion des Parenchyms von den bei den Schilddrüsen der Mäuse dieser Studie zu beobachtenden atrophischen Arealen. Hierbei handelt es sich vermutlich zumeist um eine funktionelle Atrophie infolge von T3- / T4-Hyperproduktion durch toxische Noduli und Versiegen der TRH- / TSH-Freisetzung (sog. partiell atrophische Knotenstruma; Dahme und Weiss, 1999) bzw. in anderen Fällen um eine durch große Tumoren erkennbar verursachte Druckatrophie unter Kompression des umgebenden Gewebes.

Außerdem besteht die Möglichkeit, dass es sich bei einem Teil der Fälle um einen Jodmangelkropf handelt (vgl. Abschnitt II.1.4.), da ein Zusammenhang mit der jodreduzierten Fütterung der Muttertiere nicht ausgeschlossen werden kann. Allerdings waren die Kontrolltiere während der Saugphase ebenfalls einem Jodmangel ausgesetzt und weitaus weniger Fälle (nur 5 %) zeigten eine Hyperplasie. Gegen diese Hypothese spricht ferner, dass die Dauer der Einwirkung des auslösenden Agens (Jodmangel) zeitlich auf die erste Lebenswoche beschränkt war und es sich bei hyperplastischen Erkrankungen um reversible Veränderungen handelt.

Zuletzt kann es sich bei einem Teil der Hyperplasien um altersbedingtes sporadisches Auftreten handeln, da es sich bei den untersuchten Tieren um Mäuse fortgeschrittenen Alters handelte (durchschnittlich 469 Tage). Zu diesen, allerdings nur selten beschriebenen, altersbedingten Veränderungen gehören insbesondere kolloidale Goiter mit Verlust der funktionellen Follikelaktivität (Walinder und Sjöden, 1972), die bei nur wenigen Kontrolltieren und Radiojod-exponierten Mäusen nachweisbar waren, sowie sekundäre Formierung hyperplastischer Noduli.

Derartige fokal auftretende Hyperplasien gelten in der Mauspathologie bisweilen als **frühneoplastische Stadien** (Ward *et al.*, 1979), da sich Neoplasien bei der Maus im Zuge hyperplastischer Schilddrüsenerkrankungen entwickeln können (Hill *et al.*, 1998). Bei einigen Patienten mit Hormonstörungskropf wurde ebenfalls über eine sekundäre Entstehung von Karzinomen berichtet, meistens handelte es sich hierbei um FK (WHO, 2004). Demgemäß ist dieser alternative Weg der Tumorentstehung bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen; auch zumal neben der großen Anzahl hyperplastischer Erkrankungen bei vorliegender Studie auffiel, dass lediglich ein strahlenassoziiertes FK ohne begleitende

## V. DISKUSSION

Hyperplasie vorzufinden war. Bei sechs der elf Fälle war eine NH und bei vier Fällen eine SH gleichzeitig vorhanden. In Anbetracht dessen, dass fast alle Karzinome von hyperplastischen Veränderungen begleitet waren, liegt nahe, dass entweder eine Progression oder zumindest eine die Karzinogenese begünstigende Konstellation bei hyperplastischer Erkrankung vorliegt. Für ein paralleles Auftreten spricht die Heterogenität gesunder Thyreozyten bzw. die unterschiedlichen Absorptionsraten (Aktivität) der Follikel und die ungleichmäßige Verteilung des Radiojods in der Schilddrüse, wodurch ein karzinogenetischer Effekt nicht gleichermaßen auf alle Thyreozyten einwirkt (Boltze, 2004). Ein FK war zudem innerhalb eines FA lokalisiert, was die Hypothese nahe legt, dass ersteres über maligne Transformation aus dem FA entstand.

Eine aussagekräftige Statistik über das Auftreten von **FA** in radioaktiv kontaminierten Regionen ist nicht vorhanden, da die vermehrte Diagnosestellung nach dem Reaktorunglück auch auf verbesserte und umfangreichere Schilddrüsenuntersuchungen seit 1986 zurückgeführt werden kann (Cardis *et al.*, 2006). Im Allgemeinen werden FA in erster Linie mit Jodmangel in Verbindung gebracht. Obwohl auch FA in 31 % der Fälle gemeinsam mit NH vorlagen, entstehen FA vermutlich ohne Vorstadium parallel zu den NH oder solitär.

Vor dem Hintergrund, dass es sich bei humanen, mit Strahlenexposition in Verbindung stehenden Karzinomen (v. a. Tschernobyl-assoziierte Fälle) überwiegend um **papilläre Karzinome** handelt (II.1.5.1.), ist es von Bedeutung, dass bei vorliegender Untersuchung ausschließlich FK diagnostiziert wurden. Es gab keinen Tumor mit ausreichender Qualität und Quantität der PK-typischen Charakteristika, weshalb auch die beiden Tumoren mit einer papillär wachsenden Komponente zu der Kategorie FK (papilläre Variante des FK, FK-PV) zu zählen waren.

In der Humanpathologie beschreiben zahlreiche Autoren im Falle der follikulär wachsenden, abgekapselten Tumoren mit variablem Grad an PK-typischen Zellkernveränderungen eine unzureichende qualitative und quantitative Definition der Kriterien, welche in kritischen Fällen zu mangelhafter diagnostischer Reproduzierbarkeit der Differenzierung zwischen FA bzw. FK und PK-FV (follikuläre Variante des PK) führen kann (Hirokawa *et al.*, 2002; Zeiger und Dackiw, 2005; Lloyd *et al.*, 2004). Wenngleich derartige Fälle in der humanpathologischen Routinediagnostik von untergeordneter Bedeutung sind, ist diese Problematik bei der Übertragung menschentumorspezifischer Merkmale auf eine andere Spezies in besonderem Maße zu berücksichtigen. Bei den charakteristischerweise im humanen PK auftretenden Milchglaszellkernen handelt es sich eigentlich um Färbeartefakte (Naganuma *et al.*, 2000). Daher erscheint es keinesfalls verwunderlich, dass ähnliche

## V. DISKUSSION

Veränderungen auch in murinen Schilddrüsentumoren beobachtet werden konnten: In der WHO-Klassifizierung ist das Auftreten „optisch leer erscheinender“ Zellkerne bei murinen Karzinomen beschrieben, ohne dass die Existenz eines „murinen PK“ erwähnt wird (Capen, 2001). Demgegenüber wurden bereits vor über 30 Jahren „murine PK“ von Walinder und Sjöden (1972, 1973) in Zusammenhang mit Strahlenexposition klassifiziert (vgl. Abschnitt II.1.5.3.2.). Die von mehreren Autoren beschriebenen „murinen PK“ bei Mausmutanten hingegen sind auf gezielte genomische Manipulation mittels humaner Transgene zurückzuführen (vgl. Abschnitt II.2.5.4. und 3.3.). Bedauerlicherweise ist weiteren verschiedentlich durchgeführten experimentellen Studien bei der Maus nicht zu entnehmen, ob es sich bei den so bezeichneten „papillären Karzinomen“ im Sinne der Humanpathologie um PK oder um FK-PV handelt (Schaller und Stevenson, 1966; Frith und Heath, 1984; Knauf *et al.*, 2005). Zusammengefasst scheint das „murine PK“ zwar zu existieren, jedoch niemals spontan und nur sehr selten in strahlenassoziierten Fällen (0,03 % bei Walinder und Sjöden, 1972) bzw. nahezu ausschließlich im Falle gezielter genomischer Manipulation vorzukommen.

Verschiedenen Autoren zufolge besteht bei der Maus dieselbe strikte Assoziation zwischen genetischer ***ret*/PTC-Rearrangierung** und der Morphologie eines PK (vgl. Abschnitte II.2.5.4. und 3.3.; Capen und Sagartz, 1998). Allerdings wurden hierbei humane *ret*/PTC-Transgene in das murine Genom integriert, wohingegen keine Berichte über derartige genetische Translokationen bei der Maus selbst vorliegen. Die Grenzen der Übertragbarkeit der *ret*/PTC-Mausmodelle auf humane PK lassen sich alleine in der Tatsache ablesen, dass es sich beim Menschen um eine erworbene somatische Mutation, bei der transgenen Maus hingegen um eine Keimbahn-determinierte Veränderung handelt. Der Entstehung der „murinen PK“ gehen daher bereits während der Embryonalentwicklung erkennbare morphologische und funktionelle Veränderungen voraus (Cho *et al.*, 1999). Zudem ist von denselben Autoren bei der Maus eine vom Expressionslevel des *ret*/PTC abhängige Tumorentwicklung und Progression beschrieben, wohingegen in der Humanpathologie keine derartige Korrelation mit klinisch bedeutsamen Parametern (Shin *et al.*, 2005), sondern lediglich eine Assoziation mit dem Ausprägungsgrad der Milchglaszellkerne besteht (Fischer *et al.*, 2003). Weitere vom humanen PK divergierende Merkmale dieser *ret*/PTC-Mausmodelle sind die fehlende Metastasierung und eine erhaltene TSH-Antwortfähigkeit der PK (Knostman *et al.*, 2007). Bei der *ret*-Rearrangierung scheint es sich um ein einzigartiges Ereignis humaner Thyreozyten (vermutlich aufgrund einer humanspezifischen dreidimensionalen Konfiguration des Chr. 10 [Fagin, 2002]) zu handeln (Pierotti, 2001),

## V. DISKUSSION

welches im Tiermodell nicht reproduzierbar ist. Diese Spezifität belegten z. B. Finn *et al.* (2004), die zeigen konnten, dass *in vitro* Bestrahlung von humanen Thyreozyten *ret*/PTC-Translokationen induziert. Den Ergebnissen der vorliegenden und auch vergleichbaren älteren Studien zufolge, führt genotoxische Strahleneinwirkung bei der Mäuseschilddrüse entweder zu andersartigen genetischen Alterationen (s. u.) oder eine gegebenenfalls existierende Rearrangierung des murinen *ret*-Protoonkogens äußert sich bei der Maus nicht oder nur unzureichend in der Entstehung der PK-typischen Merkmale. Angesichts technischer Grenzen bei der Untersuchung des *ret*-Genes bei der Maus war es bedauerlicherweise nicht möglich, eine vorliegende Rearrangierung mit einem unbekannten Partner oder eine Überexpression dieses mit der humanen strahleninduzierten Schilddrüsenkarzinogenese strikt assoziierten Fusionsgenes zu überprüfen, da mittels der angewandten LOH- und CGH-Methoden eine reziproke Translokation nicht detektierbar ist (vgl. Abschnitt II.3.2.2.). Die Verwendung des Ret-Antikörpers zur immunhistochemischen Darstellung der Expression einer *ret*/PTC-Rearrangierung ist bereits in der Humanpathologie aufgrund dessen geringer Sensitivität unüblich (Cerilli *et al.*, 2002).

In der Humanpathologie liegt eine **immunhistochemische** Cytokeratin19- und Galectin-3-Positivität bevorzugt bei malignen Tumoren vor und kann die differentialdiagnostische Abgrenzung zwischen FK und PK unterstützen (Abschnitt II.3.2.3.). Die Tatsache, dass bei der hier vorliegenden Studie keine Reaktivität der beiden gegen humane Epitope gerichteten Antikörper mit Mäuse-FK nachgewiesen werden konnte (murine Antikörper sind nicht im Handel), ist in ihrer Aussagekraft dadurch beeinträchtigt, dass keine „echte“ murine Kontrolle mit erwiesener Positivität zur Verfügung stand. Der einzig existierende Bericht über die Erstellung eines immunhistochemischen Profils bei murinen Schilddrüsentumoren ist in chinesischer Sprache verfasst, woraus weder das zugrunde gelegte Klassifizierungsschema noch die verwendeten Antikörperklone hervorgehen (Chen *et al.*, 2002).

**Solides Wachstum** war in einer Vielzahl hyper- und neoplastischer Veränderungen bei vorliegender Studie zu beobachten. Überwiegend handelte es sich hierbei um atypische FA und FK bei denen eine Korrelation zwischen solidem Wachstum und erhöhter Mitoserate bzw. Invasivität zu beobachten war. Strahlen- (Tschernobyl-) assoziierte humane Schilddrüsentumoren zeigt auffallend häufig, v. a. bei Kindern, ein mit *ret*/PTC3-Rearrangierung in Verbindung stehendes, solides Wachstum der papillären Karzinome (PK-SV) (Thomas *et al.*, 1999). Der Anteil solide wachsender Tumoren in der Gruppe der Radiojod-behandelten Mäuse wich jedoch nicht von dem der Kontrolltiere ab, so dass keine Assoziation zwischen solidem Wachstum und Strahlenexposition vorlag.

## V. DISKUSSION

Obwohl bei vorliegender Untersuchung sämtliche diagnostizierten Karzinome der Gruppe der FK zuzuordnen waren, waren gleichzeitig Charakteristika zu beobachten, welche primär in Zusammenhang mit humanen strahlenassoziierten PK beschrieben sind: Neben bereits genannter Begleitung durch hyperplastische Veränderungen zählt hierzu insbesondere die in 50 % der Fälle vorliegende **Multizentrität** der Karzinome. Bei zwei der hier diagnostizierten Karzinome lag bilaterales und bei dreien multifokales Tumorwachstum vor. Der Möglichkeit einer multizentrischen Tumorentstehung steht die Hypothese einer intrathyroidalen (lymphogenen) Disseminierung der Tumorzellen gegenüber, wie sie beim humanen papillären Karzinom (PK) häufig zu beobachten ist (Rosai, 2004). Demnach handelt es sich bei den murinen strahlenassoziierten Karzinomen um eine intermediäre Kategorie mit der Morphologie eines FK und teilweise dem biologischen Verhalten eines PK.

### 1.3. Fazit aus der histologischen Untersuchung

Bei einer vergleichsweise geringen Inzidenz neoplastischer Schilddrüsenerkrankungen dominierte das Bild nodulärer und auch simpler Hyperplasien, welche im Vergleich zur nicht Radiojod-behandelten Kontrollgruppe (5 %) mit einer deutlich signifikant erhöhten Häufigkeit von 44 % diagnostiziert wurden. Dass zudem bei zehn der elf (91 %) Karzinome gleichzeitig hyperplastische Veränderungen vorlagen, impliziert, dass es sich bei den Hyperplasien um prämaligne Stadien einer progressiven Tumorentwicklung handeln könnte, welche auf durch mutagene Strahleneinwirkung verursachte genetische Instabilität zurückzuführen ist und durch klonale Selektion sekundär zu Tumoren führt.

Bei den diagnostizierten Karzinomen handelte es sich ausschließlich um FK. Demnach unterscheidet sich die strahlenassoziierte Schilddrüsenkarzinogenese bei der Maus zumindest morphologisch in signifikanter Weise von der des Menschen. Das Mausmodell zeigt jedoch eine gute Vergleichbarkeit mit der Entstehung von NH, FA oder FK, welche beim Menschen in erster Linie mit Jodmangel assoziiert werden, jedoch in Zusammenhang mit externer und interner Strahlungsexposition ebenfalls beschrieben sind (Pacini *et al.*, 1999; Shore *et al.*, 1993; WHO, 2004). Somit liegt die entscheidende tumorinduzierende Bedeutung bei dem Mausmodell in dem additiven Effekt von proliferationsförderndem Jodmangel und mutagener Strahlung begründet und offeriert die Erforschung der den follikulären Tumoren zugrunde liegenden genetischen Mechanismen, welche beim Menschen bislang nur unzureichend geklärt sind (WHO, 2004).

### **2. Genetik**

Moderne molekulargenetische Studien bei Tumoren von sowohl Menschen als auch Mäusen können zu einer verbesserten Vergleichbarkeit der Schilddrüsenläsionen beider Spezies beitragen und ermöglichen die Untersuchung schilddrüsenkarzinogenetisch bedeutsamer Mechanismen. Trotz fortschreitender Erkenntnisse über das Mausgenom, die sich in der Existenz mehrerer tausend Mutantenlinien reflektieren, ist zu beachten, dass diese Mutanten nur etwa 10 % aller Gene des Mausgenoms umfassen und die biologische Funktion der meisten verbleibenden Gene bislang unbekannt ist (Maddison und Clarke, 2005). Die verfügbare Probenmaterialmenge, infolge der geringen Inzidenz induzierter und zum Vergleich dienender spontaner Tumoren, sowie bedingt durch das geringe Volumen der Mäuseschilddrüse und deren Tumoren, war bei vorliegender Studie der limitierende Faktor für den Umfang der molekulargenetischen Untersuchungen. Aufgrund dessen wurden die LOH- (*Loss of Heterozygosity*-) Studie mit 40 F1-Mäusen (sieben opB, 12 SH, 10 NH, 10 FA, ein FK) und die CGH- (komparative genomische Hybridsierungs-) Studie mit 25 Proben aus 21 F2-Mäusen (zwei opB, eine SH, 12 NH, zwei FA, acht FK) getrennt voneinander durchgeführt, so dass nur eine mittelbare Gegenüberstellung der Ergebnisse beider Methoden möglich ist.

#### **2.1. LOH- und FISH-Analyse: Mikrosatelliten-Imbalancen**

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte LOH-Untersuchung mit über dem Genom verteilten Mikrosatelliten-Markern diente der Ermittlung der Inzidenz genetischer Instabilität. Die nähere Betrachtung von neun Loci in der Nähe bereits bekannter Tumorgene sollte zudem eine mögliche Beteiligung dieser Gene bei der murinen, strahlenassoziierten Schilddrüsenkarzinogenese aufzeigen. Bei den Kandidatengenomen handelte es sich hauptsächlich um die Tumorsuppressorgene (TSG) *p16*, *p53*, *Pten* und *Rb1*. In humanen Schilddrüsentumoren ist neben vereinzeltem Vorkommen von *Rb1*-Verlust und *Met*-Überexpression beim PK die Assoziation eines *p53*-Verlusts mit anaplastischen Schilddrüsentumoren beschrieben (Abschnitt II.3.1.). Ein *p16*-Verlust scheint ebenfalls bei der Entdifferenzierung humaner Karzinome gemeinsam mit weiteren Genen von Bedeutung zu sein (Ball *et al.*, 2006). *Pten*-haploinsuffiziente Mäuse (*Pten*<sup>+/-</sup>) entwickelten laut Di Cristofano *et al.* (1998) maligne Tumoren verschiedenster Organe, u. a. PK der Schilddrüse,



## V. DISKUSSION

wohingegen dieses TSG bei humanen Schilddrüsentumoren eine untergeordnete Rolle spielt (Gimm *et al.*, 2000).

Die hier durchgeführte LOH-Studie offenbarte einen bedeutsam erhöhten Anteil an Mikrosatelliten-Loci mit LOH bei den **FA** auf den Chromosomen (Chr.) 4 (*p16*), 5, 6, 11 (*p53*), 14 (*Rb1*) und 19 (*Pten*). Die allelischen Verluste traten in signifikanter Weise bevorzugt bei 75 % (3/4) der strahlenassoziierten Adenome von H6F1-Mäusen auf, und lassen vermuten, dass ein unbekannter genetischer Faktor mit Einfluss auf die genetische Stabilität eine Rolle spielt. Die LOH zeigten sich hierbei in verschiedenster Lokalisation ohne spezifische Häufung; nur ein Locus auf Chr. 5 war bei mehr als einem Adenom betroffen. Das bei einem FA auf Chr. 6 vorgefundene sog. „Zebra-Muster“ (d. h. durch heterozygote Mikrosatelliten unterbrochene Allelverluste) ist auch aus anderen Studien bekannt und führt, v. a. bei genomumfassenden LOH-Studien, zu komplexen LOH-Profilen, deren Bedeutung oft unklar ist (Tomlinson *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu den drei strahlenassoziierten FA mit LOH auf einem (Chr. 19), zwei (Chr. 4 und 5) bzw. vier (Chr. 5, 6, 11, 14) Loci war das (einzig vorhandene) **spontane FA** der H6F1-Kontrollgruppe auf denselben untersuchten Loci frei von Allelverlusten, und deutet auf unterschiedliche Wege der Tumorentstehung auf molekularer Ebene bei spontanen und strahlenassoziierten FA hin.

Analog zu den Ergebnissen zahlreicher LOH-Studien bei humanen FA (vgl. Abschnitt II.3.2.2.1.) können demnach gutartige Schilddrüsentumoren der Maus ebenfalls von multiplen Allelverlusten betroffen sein. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass es sich bei dem untersuchten Probenumfang insgesamt um lediglich fünf FA bei H6F1-Mäusen handelte, welche keine generellen Rückschlüsse auf eine Grundgesamtheit zulassen. Ob der begrenzt verfügbaren Probenmaterialmenge war es in den meisten Fällen nicht möglich, die Grenzen der deletierten Regionen abschließend zu eruieren (vgl. Tab. IV.18.). Demnach könnte es sich teilweise um Alterationen handeln, welche Regionen auf ganzchromosomaler bzw. chromosomaler Ebene betreffen, womit eine Vielzahl verschiedener Gene deletiert wäre. Dies gilt es bei Betrachtung spezieller „Kandidatengene“ zu berücksichtigen. Kandidatengene in der Nähe der deletierten Mikrosatelliten-Loci sind die TSG *p16*, *p53*, *Rb1* und *Pten*. In Anbetracht der Tatsache, dass es sich hier um Alterationen bei benignen Tumoren handelt, lässt sich folgern, dass der / die entscheidenden Schritte für maligne Entartung möglicherweise noch ausstehen, eine prädisponierende Konstellation in Form einer hemizygoten Deletion von TSG jedoch gegebenenfalls vorhanden ist (vgl. Abschnitt II.3.1.2.2.), welche - vermutlich in Kollaboration mit weiteren genetischen Alterationen und Mutationen - zur Entstehung der FA führte. Das effektive Vorliegen einer Deletion der TSG

## V. DISKUSSION

gilt es mittels ergänzender molekulargenetischer (intragenischer) Methoden in jedem Fall zu bestätigen.

In vier Fällen mit NH (40 %) lag ein auf die PCR-Amplifikate eines Markers (D14Mit125) beschränkter Allelverlust auf Chr. 14 vor. Aufgrund der Befunde, dass eines der (atypischen) FA ebenfalls mit in der Nähe des **Rb1**-Genes kartierenden Mikrosatelliten-Markern Verlust der Heterozygotie gezeigt hatte, wurde mittels ergänzender intragenischer FISH- (Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungs-) Sonde ein Verlust des *Rb1*-Genes überprüft. Ein signifikanter Genverlust konnte hierbei jedoch nicht nachgewiesen werden, obwohl bei dem FA ein vergleichsweise hoher Anteil *Rb1*-monozygoter Zellkerne vorlag. Die PCR-basierte LOH-Studie ist somit die sensitivere der beiden Methoden. Aufgrund der vorhandenen intratumoralen Heterogenität von Schilddrüsentumoren (Trovato *et al.*, 2004) besteht die Möglichkeit, dass nur eine Subpopulation des Tumors gleichartige Allelverluste aufwies, welche im Rahmen der FISH-Analyse bei der Auswertung von ca. 100 Zellen nicht nachvollziehbar war. Zu berücksichtigen gilt weiterhin, dass die bei der FISH-Auswertung herangezogene Signifikanzgrenze mit dreifacher Standardabweichung äußerst restriktiv festgelegt wurde. Demgegenüber ist die Spezifität der LOH-Analyse unter bestimmten Umständen eingeschränkt. Eine hierbei zu berücksichtigende Fehlerquelle besteht, analog zur CGH-Methode (s. u.), in dem Vergleich zwischen frischem (tiefgefrorenem) Normalgewebe und der aus fixiertem Gewebe extrahierten DNA des Schilddrüsenorgans. Die auf Fragmentierung der DNA beruhende verminderte DNA-Qualität bei Formalinfixierung kann sich in Form eines artifiziellen Allelverlusts darstellen (Sieben *et al.*, 2000). Darüber hinaus können PCR-Artefakte, insbesondere bei geringen eingesetzten DNA-Mengen, in größerem Umfang vorhanden sein, wobei die größere stochastische Variation in der Amplifizierungseffizienz jedes Allels bisweilen falsch-positive Detektionen von LOH oder allelischer Imbalancen (AI) nach sich ziehen kann (Devilee *et al.*, 2001). Durch eine Mindest-DNA-Konzentration von 10 ng (Tomlinson *et al.*, 2002), sowie durch den Einsatz mehrerer Marker für denselben Locus und mittels einer ein- bis zweimaligen Wiederholung zur Bestätigung vorliegender LOH wurde das Risiko artifizieller LOH-Detektion reduziert. Zusammengefasst kann ein karzinogenetisch bedeutsamer, hemizygoter *Rb1*-Genverlust bei dem atypischen FA nicht ausgeschlossen werden, da Allelverluste bei der LOH-Untersuchung vorlagen, welche jedoch mittels FISH-Analyse nicht zweifelsfrei bestätigt werden konnten. Eine weiterführende Überprüfung (mit Array-CGH oder Genexpressionsanalysen) war ob der erschöpften Probenmaterialmenge nicht möglich. Bei den NH hingegen lag keine Deletion des *Rb1*-Lokus vor.

## V. DISKUSSION

In Anlehnung an das 2-Treffer-Modell nach Knudson (1996; vgl. Abschnitt II.3.1.2.2.) wurden LOH-Studien bei humanen Tumoren in großem Umfang mit dem Ziel, weitere TSG zu identifizieren, eingesetzt. Mit wenigen Ausnahmen blieben diese jedoch überwiegend ergebnislos, obwohl charakteristische Veränderungen z. T. konstanterweise mit spezifischen Tumortypen in Verbindung gebracht werden konnten (Devilee *et al.*, 2001). Ursächlich werden insbesondere mit dem Knudson-2-Treffer-Modell nicht kompatible Mechanismen der Karzinogenese genannt, da beispielsweise mittels CGH-Studie erhobene, zytogenetische Daten aufzeigten, dass Aneuploidie, Polyploidie oder komplexe Karyotypen in einer Vielzahl an Tumoren charakteristischerweise vorliegen (Duesberg und Rasnick, 2005).

### 2.2. CGH-Analyse

#### 2.2.1. Etablierung der Array-CGH aus FFPE-Gewebe bei der Maus

Im Rahmen des vorliegenden Experiments wurden die Proben-DNA aus Formalin-fixiertem Paraffin-eingebettetem (**FFPE**-) Gewebe gewonnen. Bei der Maus existieren bislang keine Publikationen über Array-CGH-Analysen aus FFPE-Gewebe, obwohl die Methode zur Detektion von chromosomalen Imbalancen und von Tumorkandidatengenomen bei murinen Tumoren aus Frischgewebe bereits mehrfach erfolgreich durchgeführt wurde (Takabatake *et al.*, 2006; Sander *et al.*, 2005; Hodgson *et al.*, 2001; Hackett *et al.*, 2003; Sweet-Cordero *et al.*, 2005). Über die Verwendung von FFPE-Gewebe als Ausgangsmaterial wurde bisher nur in wenigen Studien bei menschlichem Tumorgewebe berichtet, während andere Untersuchungen weiterhin auf die Etablierung dieser Methode bei humanem FFPE-Gewebe abzielen (Johnson *et al.*, 2006). Wie bereits oben beschrieben, kommt es im Zuge der Formalin-Fixierung zu einer Fragmentierung der DNA, so dass es sich hierbei um niedermolekulare DNA handelt, deren Verwendung zu einer größeren Varianz der ermittelten Werte bei der Array-CGH führt. Für die Array-CGH bei der Maus aus Frischgewebe sind akzeptierbare Anteile nicht-neoplastischer Zellen in der Probe mit Werten von 40 bis 60 % beziffert (Sweet-Cordero *et al.*, 2005; Hackett *et al.*, 2003), wohingegen - bedingt durch die geringere Sensitivität - bei der Array-CGH aus FFPE-Gewebe (beim Menschen) ein maximaler Kontaminationsgrad von 30 % als tolerierbar gilt (Johnson *et al.*, 2006). Die in dieser Arbeit durchgeführte Laser-Mikrodissektion zur Isolierung der Tumorzellen diente der Minimierung nicht-neoplastischer Zellen im Isolat und war demnach wesentliche Voraussetzung für die Interpretierbarkeit der erzielten Ergebnisse, da hierdurch die

## V. DISKUSSION

Wahrscheinlichkeit für eine durch Kontamination bedingte Interferenz mit einer vorliegenden genomischen Aberration reduziert wurde.

Im Rahmen eines Vorversuches ließ sich bei vorliegender Untersuchung ermitteln, dass gleichartige Gewebeprevorbehandlung und -herkunft von Referenz- und Proben-DNA eine verbesserte CGH-Qualität mit geringerer Streuung der Array-Daten nach sich zog (Abschnitt IV.4.1.). Bei CGH aus FFPE-Gewebe ist die Verwendung von aus FFPE isolierter DNA als Kontrolle (Hybridisierungspartner) vermutlich generell besser geeignet als die aus frisch gefrorenem Gewebe (z. B. Schwanzspitzen) gewonnene DNA, da die durch Formalin-Fixierung bewirkte DNA-Fragmentierung bevorzugt an hierfür prädisponierten Bruchstellen erfolgt (Romero *et al.*, 1997) und die gleichgerichtete Fraktionierung der DNA zu gleichartiger DNA-Qualität zwischen Proben- und Referenz-DNA und damit zu einer Reduktion falsch-positiver Ergebnisse beiträgt.

Dennoch war in der vorliegenden Studie eine deutliche **Variabilität** (Standardabweichung zwischen 0,045 und 0,242) der Array-Daten-Qualität zwischen den Fällen anhand unterschiedlich starker Ausprägung der Streuung der Einzelwerte zu beobachten, welche auf ungleiche DNA-Integrität zurückzuführen ist. Johnson *et al.* (2006) ermittelten bei einem direkten Vergleich von frisch gefrorenem mit FFPE-Gewebe eine, in positiver Korrelation zu der ermittelten DNA-Integrität stehende, bedingte Reproduzierbarkeit. Bei vorliegendem Probenmaterial wurde die DNA-Integrität dementsprechend vor der Hybridisierung überprüft und eine von dem Autor formulierte Mindest-DNA-Fragmentlänge von 300 bp nachgewiesen. Bei der Array-CGH aus FFPE-Gewebe gilt die Unterscheidung zwischen echten Alterationen und experimentellen Artefakten aufgrund dieser vermehrten Streuung der Daten als erschwert. Auf einzelne Klone limitierte Alterationen zeigen eine generell schlechte Reproduzierbarkeit mit in der Literatur beschriebenen Werten von etwa 16%iger Übereinstimmung bei Versuchswiederholung, wobei Artefakte einzelner BAC-Klone nicht nur streuungsbedingt und zufällig verteilt auftreten können, sondern auch durch *Mismapping* oder Kreuzhybridisierung repetitiver Sequenzen in reproduzierbarer Form zustande kommen (Johnson *et al.*, 2006). Die - in Anpassung an die größere Streuung erfolgte - restriktiverer Festlegung der Signifikanzkriterien für das Vorliegen einer Amplifizierung bzw. Deletion auf drei (statt zwei laut Johnson *et al.*, 2006) konsekutive BACs (zweifache Standardabweichung als Schwellenwert) bedingt zwar eine beta-Fehler-Erhöhung (erhöhte Gefahr nicht-detektierbarer Imbalancen), gewährleistet jedoch die Spezifität durch Minimierung falsch-positiver Ergebnisse in ausreichendem Maße (Draghici, 2003).

### 2.2.2. Chromosomale Imbalancen

Die in der hier dargestellten Arbeit angewandte hochauflösende (1-Mb-) BAC Array-CGH-Methode ermöglicht eine genomweite Detektion von Deletionen und Amplifikationen im Tumorgewebe, nicht jedoch von Translokationen. Es war zu beobachten, dass das Ausmaß **chromosomaler Imbalancen** bezüglich Anzahl und Größe betroffener Regionen von SH und NH über FA zum FK deutlich zunahm: Eine bestehende genetische Instabilität der benignen Läsionen war anhand von Alterationen in unterschiedlicher Lokalisation von überwiegend kleiner Ausdehnung erkennbar (durchschnittlich 0,5 Loci pro NH und 1,5 Loci pro FA). Demgegenüber fielen die Karzinome durch zahlreiche ganzchromosomale Verluste oder Zugewinne, mit hoher Rekurrenz von Monosomien der Chromosomen (Chr.) 4, 9 und 14, auf. Bei Untersuchung der murinen Schilddrüsenläsionen zeigten sich wenige BAC-Klone umfassende „kleine“ Deletionen und Amplifikationen in variabler Lokalisation auf verschiedenen Chromosomen verteilt (vgl. Tabellen IV.21. und 23.). Auffällig war hierbei, dass bereits 46 % der **Hyperplasien** durch mehrere „kleine“ Alterationen auf den Chr. 4, 8, 10, 15 und 17 gekennzeichnet waren, wobei jedoch bei verschiedenen Proben keine co-lokalisierten Veränderungen identifiziert werden konnten. Obwohl im Einzelfall eine ausschlaggebende karzinogenetische Bedeutung spezifischer betroffener Gene nicht ausgeschlossen werden kann, lässt sich die unbeständige Lokalisation der „kleinen“ Alterationen als Ausdruck allgemeiner genetischer Instabilität interpretieren, zu welcher auch die erkennbare X-chromosomale Trisomie bei einer NH (Nr. 662H) zu zählen ist. Die genetische Instabilität bei den hyperplastischen Veränderungen stützt die histomorphologische Beobachtung, dass es zu progressiver Entwicklung maligner Tumoren kommen kann. Demnach induziert der Radiojodzerfall in der Schilddrüse vielfältige genomischer Alterationen und bedingt hierdurch eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für maligne Entartung. Genetische Instabilität gilt laut Fearon und Vogelstein (1990) als essentieller, begünstigender Faktor für fortschreitende Mutationen, so dass die Wahrscheinlichkeit dafür zunimmt, dass sich unter den Mutationen auch solche befinden, welche direkt oder indirekt die Entstehung von malignen Tumorzellklonen mit entscheidendem Wachstumsvorteil begünstigen oder verursachen.

Bei einem der beiden **Adenome** lagen die erkennbaren Amplifizierungen auf den q-Enden der Chr. 4 und 5 in polyploidem DNA-Gehalt vor, im Gegensatz zu allen sonstigen triploiden Zugewinnen. Amplifizierungen einzelner Genorte sind zumeist erst bei polyploidem Vorliegen der Genkopien mit deutlich erhöhter Transkriptionsrate und Genexpression von

## V. DISKUSSION

biologisch signifikanter Bedeutung. Die polyploiden Zugewinne bei diesem FA vermitteln die Annahme, dass es sich bei den beiden betroffenen Regionen um Onkogen-enthaltende Genomabschnitte handeln könnte, und die aus der Amplifizierung folgende Onkogen-Überexpression einen wesentlichen Teil der Ätiologie für diesen Tumortypen darstellen könnte. Veränderungen von zwei oder mehr aufeinander folgenden Klonen sind mit einer in der Literatur angegebenen Reproduzierbarkeit bei optimaler Versuchsanordnung von etwa 88 % angegeben (Johnson *et al.*, 2006) und erfordern daher eine ausreichende Menge vergleichbarer Tumortypen mit wiederholtem Auftreten derselben Amplifizierung, sowie eine Überprüfung der in den amplifizierten DNA-Abschnitten befindlichen Gene mittels Expressionsanalysen. Eine Ermittlung der exakten Kopienanzahl ist durch ergänzende genomische Studie (z. B. FISH) möglich.

Während bei den gutartigen Läsionen keine bevorzugt von Deletion oder Amplifizierung betroffene Region ausgemacht werden konnte, waren bei den acht **Karzinomproben** partielle oder ganzchromosomale Verluste der Chr. 4 (88 %), 9 (50 %) und 14 (38 %) gehäuft anzutreffen. Die dazugehörigen Mittelwerte der  $\log_2$ -Ratios einer Monosomie betrugen zwischen -0,043 und -0,248 im Vergleich zu einem rechnerischen Wert der 1:2-Ratio für Monosomie von -0,69. Die Mittelwerte der  $\log_2$ -Ratios bei vorliegender Trisomie bezüglich den Chr. 6 und 15 lagen mit dazugehörigen Werten von 0,119 und 0,111 ebenfalls unterhalb des rechnerischen Werts der 3:2-Ratio von 0,405. Über die unterhalb des erwarteten Wertes liegenden  $\log_2$ -Ratios eines solchen Experiments gibt es allerdings Berichte sowohl aus humanen (Snijders *et al.*, 2001; Fiegler *et al.*, 2003) als auch murinen CGH-Analysen. Ursächlich besteht entweder die Möglichkeit, dass eine unvollständige Suppression von repetitiven Sequenzen der BACs vorhanden ist, oder dass eine Kreuz-Hybridisierung von Sequenzen mit starker Homologie besteht (Chung *et al.*, 2004). Da eine interferierende Nicht-Tumorzell-Kontamination weitestgehend ausgeschlossen werden kann, besteht zudem die Möglichkeit, dass, aufgrund der Heterogenität von Schilddrüsentumoren (s. o.), die gegenseitige Überlagerung der chromosomalen Alterationen einzelner Tumorzellklone zu einer verminderten Darstellungsqualität führt.

Chromosomale Aberrationen gehören neben Genmutationen zu den charakteristischen Merkmalen maligner Tumoren, deren gehäuftes Vorkommen auch bei humanen Schilddrüsentumoren, insbesondere beim FK und auch FA (Hemmer *et al.*, 1999) dokumentiert wurde. Kimmel *et al.* (2006) konnten darüber hinaus bei humanen Tschernobyl-assoziierten PK im Gegensatz zu spontanen PK eine genomweite Akkumulation chromosomaler Ungleichgewichte (überwiegend Zugewinne) mittels Array-CGH ermitteln.

## V. DISKUSSION

Dies galt auch in Fällen, bei welchen die charakteristischerweise mit PK in Verbindung gebrachten Rearrangierungen des *ret* oder *NTRK1*-Genes gleichzeitig vorhanden waren. Die vorliegende Studie bestätigt daher die mehrfach zitierte Bedeutung von Aneuploidien bei der strahlenassoziierten Tumorinitiation. Die genotoxische Strahlenwirkung kann hierbei entweder über Mutationen der sog. „Aneuploidiegene“ oder über induzierte DNA-Doppelstrangbrüche zu Aneuploidien und zu direkter Entwicklung maligner Tumoren führen (vgl. Abschnitte II.3.1.3. und II.3.1.4.).

Alternativ zur strahleninduzierten Tumorinitiation können die Aneuploidien auch neoplastische chromosomale Imbalancen widerspiegeln, welche aus genetischer Instabilität und einer Kombination verschiedenartiger genetischer Prozesse bei der Tumorprogression resultieren. Bei Detektion von chromosomalen Anomalien stellt sich daher stets die Frage, ob es sich um primär karzinogenetisch bedeutsame Veränderungen handelt, oder um sekundäre Ereignisse bei Tumorzellproliferation, welche dennoch im Rahmen der Tumorprogression von katalytischer Bedeutung sein können (Pihan und Doxsey, 2003; Duesberg und Rasnick, 2000). Ob chromosomale Instabilität ein erforderlicher Schritt der Tumorprogression („Aneuploidiehypothese“), oder lediglich eine Nebenerscheinung bei der Onkogen-Aktivierung ist („Genmutationshypothese“), ist nur unzureichend geklärt (Woo und Poon, 2004a und b).

Entsprechend der Aneuploidiehypothese, wonach eine Vielzahl von Alteration betroffener Gene in ihrem Zusammenspiel für die Tumorentstehung verantwortlich gemacht wird, erscheinen Einzelgenmutationen demnach bei der Tumorinitiation, -progression oder malignen Transformation der hier untersuchten murinen strahleninduzierten Schilddrüsentumoren von untergeordneter Bedeutung. Dennoch rechtfertigt das Auftreten spezifischer Deletionen in konstanter Assoziation mit den Karzinomen die Annahme, dass jene in unbalancierten Chromosomenregionen lokalisierten **Gene** (Tumorsuppressorgene) bei Tumorinduktion und Progression eine wesentliche Rolle spielen. Bei den für weitere Untersuchungen vorzuschlagenden deletierten DNA-Abschnitten handelt es sich der vorliegenden Studie zufolge, entsprechend der gemeinsam überlappenden DNA-Abschnitte (MCR) bei den Karzinomen, um die q-terminalen Bereiche der Chr. 4 (ab 125,5 Mb) und 9 (ab 30 Mb), sowie um einen zwischen 21,9 und 69,2 Mb lokalisierten Bereich auf Chr. 14.

Bei vorliegender Untersuchung war zudem zu berücksichtigen, dass es sich bei den acht untersuchten Karzinomproben um sechs verschiedene Mäuse handelte. Die Andersartigkeit der beidseits vorhandenen Karzinome spiegelt sich sowohl in ihrem histologischen Wachstumsmuster als auch in ihrem CGH-Profil wieder. Bei Betrachtung sämtlicher Fälle

## V. DISKUSSION

konnte eine allgemeine Korrelation zwischen Wachstumsmuster und CGH-Profil jedoch nicht hergestellt werden. Gemeinsam überlappende chromosomale Bereiche waren bei den beidseits vorhandenen karzinomatösen Veränderungen (**bilaterale FK**) des jeweils selben Tieres ausschließlich auf einen (partiellen) Chr. 4-Verlust beschränkt. Das bifokale Auftreten des Karzinoms kann entweder von intrathyreoidaler Disseminierung (Mikrometastasierung) oder von multizentrischer Tumorinitiation herrühren. Unter Annahme einer zugrunde liegenden Disseminierung besteht der Verdacht auf eine Vorläuferläsion mit (partiellem) Chr. 4-Verlust, welcher bei postmetastatischer Tumorprogression weitere Aberrationen der verschiedenen Tumorzellklone ohne Prädispositionsstelle begünstigt. Demgemäß kann es sich bei dem gemeinsam vorliegenden Chromosomenverlust um ein initiales karzinogenetisches Ereignis handeln. Gegen eine Funktion der Deletion bei der Mikrometastasenbildung spricht, dass die Tumoren anderer Mäuse denselben Chr. 4-Verlust, jedoch keine intraglanduläre Disseminierung aufwiesen.

Das **spontane FK** war von denselben genetischen Aberrationen auf den Chr. 4 und 9 betroffen, wie sie auch bei den strahlenassoziierten FK gehäuft auftraten. Daher scheinen auf diesen Chromosomen essentielle Tumorgene für die FK-Entstehung lokalisiert zu sein. Die Eruierung, ob spezifische, durch Strahlung induzierte genetische Veränderungen existieren, erfordert hingegen die molekulargenetische Gegenüberstellung einer größeren Anzahl an Tumoren, welcher durch die geringe Inzidenz spontaner Schilddrüsentumoren bei der Maus in seiner Ausführbarkeit begrenzt ist. Desgleichen konnte jedoch auch bei humanen Tschernobyl-assoziierten PK kein distinktives Array-Profil gegenüber spontanen PK ermittelt werden (Detours *et al.*, 2005).

Ob im Falle einer Monosomie der Chr. 4, 9 und / oder 14 eine weitere die Aneuploidie begünstigende Konstellation vorliegt (Duesberg und Li, 2003), war nur bei den beidseits vorhandenen Karzinomen einer einzigen Maus zu beobachten. Hierbei war der papillär wachsende Tumor in einem Lobus von einer partiellen Chr. 8-Deletion und einer Chr. 15-Trisomie und der solide Anteil im anderen Lobus von einer Chr. 5-Monosomie und einer Chr. 6-Trisomie begleitet. Da es sich hierbei, wie bereits erwähnt, nur um eine von zwei JHF2-Mäusen handelte, lässt dies ob der geringen Tierzahl keine Rückschlüsse hinsichtlich einer Einflussnahme von genetischen Faktoren zu, welche von den J6F2-Mäusen differieren.



### 2.3. Fazit aus der CGH- und der LOH-Studie

Analog zur Histomorphologie der murinen FK ist auch eine zytogenetische Parallelität zu den humanen FK evident, welche im Vergleich zum PK gehäuft Aneuploidien aufweisen (WHO, 2004). Interessanterweise zeigten auch die CGH-Profile der hier untersuchten strahlenassoziierten murinen FK hochgradig chromosomale Aberrationen. Im Gegensatz hierzu waren bei dem von Ying *et al.* (2003) erstellten Profil von aus TSH-Hyperstimulierung resultierenden Karzinomen bei TR $\beta$ - (Thyroid-Hormon-Rezeptor-) Mutanten keine Aneuploidien erkennbar. Bei den untersuchten FK vorliegender Arbeit fiel neben der allgemeinen Häufung genomischer Imbalancen ein signifikantes Auftreten gleichartiger Alterationen (Monosomien der Chr. 4, 9 und 14) auf, so dass es sich hierbei entweder um eine primäre Schädigung von hierfür prädisponierten Genom-Loci bei der Tumorinitiation oder um eine sekundäre Selektion während der Tumorprogression handelt, welche in beiden Fällen den Tumorzellen einen entscheidenden Wachstumsvorteil verschaffen. In Übereinstimmung mit den chromosomalen Veränderungen der strahlenassoziierten Karzinome waren Monosomien der Chr. 4 und 9 ebenfalls bei dem einzigen spontanen FK der Kontrollgruppe vorhanden, so dass gefolgert werden kann, dass es sich hierbei nicht um eine spezifisch durch Strahlung induzierte Veränderungen handelt, sondern um eine generell bei der murinen Schilddrüsenkarzinogenese folgeschwere genetische Alterationen, deren erhöhtes Auftreten (Inzidenz) mit der Strahlungsexposition positiv korreliert. Der zunehmende Wachstumsvorteil bei Tumorprogression der FK scheint hier weniger aus großen Effekten von wenigen betroffenen Loci, sondern vielmehr aus polygenetisch agierenden Veränderungen zu resultieren. Dies widerlegt die Beobachtung von Ward (2002), dass murine (induzierte) Tumoren i. A. weniger komplexe genetische Veränderungen aufweisen und zur Tumorentstehung benötigen als humane Tumoren, und offenbart zugleich die Homologie zwischen murinen und humanen FK im Kontrast zu Tumoren anderer Organe (z. B. Leber).

Die **Chr. 4-Monosomie** repräsentiert die bevorzugte Chromosomenaberration bei den murinen FK (88 %). Darüber hinaus bestätigten auch die mittels LOH-Studie ermittelten allelischen Imbalancen auf Chr. 4 (nahe *p16*-Locus) bei einem FA und die Tatsache, dass bei der CGH-Untersuchung auf diesem Chromosom lokalisierte Alterationen (zwei amplifizierte und eine deletierte Region) bei Hyperplasien und bei einem FA erkennbar waren, eine in Chr. 4 liegende, vom übrigen Chromosomensatz abweichende höhere Suszeptibilität für DNA-Schädigung. Mit Ausnahme einer NH waren die Veränderungen anders als bei den FK im proximalen Chromosomenabschnitt lokalisiert, so dass karzinogenetisch bedeutsame

## V. DISKUSSION

Veränderungen bevorzugt am q-Ende des Chromosoms zu vermuten sind (entsprechend der MCR [*minimal common region*] der FK ab 125,5 Mb).

Obwohl durch die FISH-Analyse eine im Zuge der LOH-Studie angenommene Deletion des *Rb1*-Genes auf **Chr. 14** bei einem (25 %) strahlenassoziierten FA nicht definitiv belegt werden konnte, korreliert dies mit den CGH-Befunden insofern, als dass eine monosomale Chr. 14-Deletion bei 38 % der untersuchten FK nachzuweisen war. Dass es sich hierbei um ein atypisches FA handelte, belegt die histologische Ähnlichkeit zwischen atypischem FA und FK auf genetischer Ebene zusätzlich und legt nahe, dass es sich hierbei nicht um eine die Invasivität fördernde Alteration handelt. Eine Progression des atypischen FA zum FK erscheint hingegen unter der Voraussetzung zusätzlicher Mutationen analog zur Humanpathologie (Tzen *et al.*, 2003) wahrscheinlich. Neben dem *Rb1*-Gen gelten aufgrund der MCR der FK (21,9 bis 69,2 Mb) dort lokalisierte Gene als Kandidaten für eine mögliche Beteiligung am karzinogenetischen Prozess.

Während bei einem der beiden untersuchten **Adenome** von J6F2-Mäusen im CGH-Profil genauso wie bei fünf FA der BHF1- und J6F1-Mäuse und einem nicht-strahlenassoziierten FA einer H6F1-Maus im LOH-Profil keine Veränderungen nachzuweisen waren, fielen bei drei (75 %) strahlenassoziierten FA v. a. männlicher H6F1-Mäuse verschiedene deletierte Mikrosatelliten-Loci auf den Chr. 4, 5, 6, 11, 14 und 19 auf. Demgegenüber zeichnete sich das andere FA (J6F2) im Array-Profil durch polyploide Zugewinne auf telomeren Abschnitten der Chr. 4 und 5 aus. Bei den mittels LOH-Studie untersuchten Mäusen besteht ebenfalls die Möglichkeit, dass eine CGH-Analyse übereinstimmende polyploide Zugewinne aufdecken würde. Die molekularen Befunde der heterogenen Untersuchungsgruppen und Methoden zeigen trotz der geringen Tierzahl auf, dass verschiedene genetische Alterationen und Prozesse an der Entstehung der murinen FA komplementär oder alternativ beteiligt sein können, welche durch genetische Faktoren in Abhängigkeit von der Mauslinie und möglicherweise auch dem Geschlecht modifiziert werden.

Mittels LOH war bei 40 % der **NH** ein auf einen Mikrosatellitenmarker auf Chr. 14 beschränkter Allelverlust identifizierbar. Außerdem waren die in den Hyperplasien vorliegenden Veränderungen im CGH-Profil nur schwach ausgeprägt und von geringer Spezifität. Daher reflektieren die Alterationen eine allgemeine genetische Instabilität, wodurch karzinogenetische Prozesse begünstigt sein können. Ob es sich bei den NH um frühere Stadien (Präneoplasien) eines progressiven karzinogenetischen Prozesses oder um parallel auftretende Veränderungen handelt, ist nicht abschließend zu klären.

### **3. Ausblick**

Obwohl sich in zahlreichen Studien eine gute Korrelation zwischen Genprofil und Expressionsmuster zeigt (Hyman *et al.*, 2002; Pollack *et al.*, 2002; Sweet-Cordero *et al.*, 2005) sind weiterführende Untersuchungen zur Bestätigung vorliegender Deletionen oder Amplifizierungen mit einer anderen Methode, genauso wie komplementäre Genexpressionsstudien auf RNA- oder Proteinebene unerlässlich. Diese Möglichkeit ist jedoch im Rahmen der vorgelegten Arbeit ob der limitiert zur Verfügung stehenden Probenmaterialmenge, welche im Zuge der durchgeführten Analysen weitestgehend erschöpft ist, nur in Einzelfällen weiterhin gegeben.

Die vorliegende Untersuchung kann als Grundlage für weitere Studien dienen, wobei die Analyse eines homogenen Probenmaterials (bzgl. genetischem Hintergrund) mit evtl. gestaffelten Altersgruppen zu einem besseren Verständnis der bedeutsamen Mechanismen bei (strahleninduzierter) Schilddrüsenkarzinogenese und Progression beitragen kann. Aus der bei vorliegender Arbeit standardisierten histologischen Klassifizierung und der etablierten CGH-Analyse aus murinem FFPE-Gewebe ergibt sich die Möglichkeit, im Rahmen ergänzender Studien die Beteiligung spezifischer, bei vorliegender Studie in Hypothese gestellter Mechanismen einer näheren Betrachtung zu unterziehen. Neben weiteren genomumfassenden Analysen wäre es möglich, die Analysen auf bestimmte Kandidatengenorte zu fokussieren, und ferner die Rolle einer zu Onkogen-Überexpression führenden chromosomalen Rearrangierung (v. a. *ret*/PTC, *Pax/Ppar*, *TRK*) zu eruieren. Im Zuge fortschreitender Erkenntnisse gilt es somit die Vergleichbarkeit bzw. eine nicht- oder existierende Homologie zwischen humaner und muriner strahlenassoziiierter Schilddrüsenkarzinogenese abschließend zu belegen. Die murinen Tumoren zeigen eine deutliche Entsprechung zu den humanen follikulären Tumoren FA und FK und sind demzufolge gut geeignet, die genetischen Mechanismen bei der Initiation und Progression dieser Tumoren, aber auch bei der Transformation hyperplastischer Läsionen zu analysieren. Weiterhin ist in Erwägung zu ziehen, dass es sich bei der humanen *ret*/PTC-Rearrangierung zwar um eine mit der Zellkern-Morphologie des PK assoziierte Veränderung handelt, die aber möglicherweise dennoch von untergeordneter karzinogenetischer Bedeutung sein könnte. Demnach besteht trotz der speziebedingten histomorphologischen Divergenz die Aussicht, anhand des Modells entscheidend an der strahlenassoziierten Karzinogenese der PK beteiligte Gene zu identifizieren, zumal das biologische Verhalten der murinen Tumoren Übereinstimmungen mit dem humanen PK aufweist.

## **VI. ZUSAMMENFASSUNG**

Schilddrüsenkarzinome sind beim Menschen die weltweit häufigsten malignen endokrinen Tumoren. Darüber hinaus wurde in Folge des Reaktorunglückes von Tschernobyl 1986 v. a. bei Kindern eine deutliche Inzidenzzunahme in Form überwiegend papillärer Karzinome (PK) erfasst. Auf Grund der Relevanz der Erkrankung war es das Ziel dieser Arbeit, ein Mausmodell für strahleninduzierte Schilddrüsenkarzinogenese anhand eines standardisierten histologischen Klassifizierungsschemas sowie mittels molekulargenetischer Studien zu etablieren.

Vor Beginn der Untersuchung wurde trächtigen und laktierenden Muttermäusen das Radiojodisotop  $I^{131}$  in einer Dosis von 111 kBq zweimalig intraperitoneal bei gleichzeitiger Jodmangeldiät appliziert, um gezielt Schilddrüsentumoren bei deren Nachkommen (F1- und F2-Hybride der Mauslinien C57/BL6, C3H, JF1 und BALB/c) hervorzurufen. Das hieraus resultierende Sektionsmaterial wurde der vorliegenden Studie zur Verfügung gestellt.

Die Schilddrüsen von 203 Radiojod-exponierten (I131-Mäuse) und 162 Kontrolltieren wurden histologisch untersucht. Dabei wurden im Sinne einer komparativen interdisziplinären Pathologie die humanpathologischen Klassifizierungskriterien und Termini zu Grunde gelegt (WHO, 2004). Die Untersuchung ergab in der Gruppe der Radiojod-exponierten Tiere 24 % simple Hyperplasien (SH), 20 % noduläre Hyperplasien (NH), 7 % follikuläre Adenome (FA) und 5 % follikuläre Karzinome (FK), unter den Kontrolltieren je 3 % SH und NH sowie je 1 % FA und FK (Spontantumoren). Obwohl es sich im Gegensatz zu humanen strahlenassoziierten Karzinomen nicht um PK, sondern ausschließlich um FK handelte, war hier ein intermediärer Tumortyp mit z. T. einem humanen PK ähnlichem biologischem Verhalten zu beobachten. Das bei den strahlenexponierten Mäusen signifikant erhöhte Auftreten von Hyperplasien sowie deren gehäufte Koexistenz mit den FK legt die Vermutung einer bestehenden Progression oder zumindest einer die Karzinogenese begünstigenden Konstellation bei hyperplastischer Erkrankung nahe.

Zur Exploration der molekulargenetischen Aberrationen in den Schilddrüsentumoren wurden die *Loss of Heterozygosity* (LOH) -Analyse mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR), die „komparative genomische Hybridisierung“ (CGH) und ergänzend die „Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) angewandt. Bislang findet sich in der Literatur noch keine etablierte Anwendung der CGH bei der Maus aus Formalin-fixiertem, Paraffin-eingebettetem (FFPE-) Gewebe, so dass ein wesentlicher Bestandteil der vorliegenden Arbeit der Evaluierung dieser Methode galt.

Bei 40 F1-Mäusen (sieben gesunde Schilddrüsen [opB], 12 SH, 10 NH, 10 FA, ein FK) wurde eine LOH-Studie mit 36 Mikrosatelliten-Markern auf neun verschiedenen Loci durchgeführt. Allelverluste waren - abgesehen von einer auf einen Marker auf Chromosom (Chr.) 14 beschränkten LOH bei 40 % der NH der H6F1-Mäuse - ausschließlich bei 75 % der strahlenassoziierten FA bei H6F1-Mäusen auf den Chr. 4, 5, 6, 11, 14 und / oder 19 zu identifizieren und lassen vermuten, dass ein mauslinienspezifischer genetischer Faktor mit Einfluss auf das allelische Gleichgewicht besteht. Im Falle eines atypischen FA der genannten H6F1-Mäuse mit LOH besteht auch nach ergänzend durchgeführter FISH-Analyse mit einer intragenischen *Rb1*-Sonde weiterhin der Verdacht, dass das *Rb1*-Tumorsuppressorgen auf Chr. 14 deletiert und von karzinogenetischer Bedeutung sein kann.

Die CGH-Analyse erfolgte bei 21 verschiedenen F2-Mäusen (zwei opB, eine SH, 12 NH, zwei FA und acht FK). Eine dadurch nachgewiesene genetische Instabilität bei 46 % der Hyperplasien in Form von wenigen regional begrenzten Veränderungen ohne bevorzugte Lokalisation kann eine maligne Progression begünstigen. Bei einem der beiden FA waren zwei polyploide regionale Alterationen q-terminal der Chr. 4 und 5 erkennbar und begründen den Verdacht auf dort lokalisierte Onkogene. Zugleich wird unter Einbeziehung der LOH-Ergebnisse ein breites Spektrum der bei der murinen FA-Entstehung beteiligten genetischen Alterationen ersichtlich. Die FK hingegen zeigten eine signifikante Zunahme an Aneuploidien, mit gehäuftem Auftreten von Monosomien der Chr. 4 (88 %), 9 (50 %) und 14 (38 %). Da bei dem einzigen vorhandenen spontanen FK der Kontrolltiere ebenfalls eine Deletion der Chr. 4 und 9 vorlag, handelt es sich hierbei vermutlich um einen essentiellen karzinogenetischen Mechanismus beim murinen FK. Durch Strahlenexposition erhöht sich demnach primär die Inzidenz der chromosomalen Aberrationen, nicht jedoch die Art.

Detaillierte Einblicke in molekulargenetische Veränderungen bei der Schilddrüsentumorentstehung im Mausmodell, können fortschreitende Erkenntnisse über die Pathogenese verschiedener Tumortypen liefern. In sinnvoller Ergänzung mit den Ergebnissen humanpathologischer und in Zellkultur durchgeführter Studien tragen diese zu einem besseren Verständnis der beteiligten Stoffwechselwege mit diagnostischer, prognostischer oder therapeutischer Relevanz bei. Die Resultate der vorgelegten Studie zeigen eine deutliche morphologische und genetische Divergenz zwischen humanen (PK) und murinen (FK) strahlenassoziierten Schilddrüsentumoren, offenbaren jedoch eine große Similarität zu den humanen follikulären Tumoren, und können viel versprechende Erkenntnisse bezüglich der Karzinogenese, Initiation und Progression der follikulären Tumoren FA und FK liefern, welche aus einem kooperativen Effekt von Radiojod und Jodmangel resultiert.

**SUMMARY**

Gabriele Cornelia Hölzlwimmer

Histological and Molecular Genetic Analysis of Radiation-induced Thyroid Tumors in a Mouse Model

Thyroid cancer derived from follicular epithelial cells is the most common endocrine malignancy in man. An increased incidence of predominantly papillary thyroid carcinomas (PTC) was found in children exposed to radiation after the Chernobyl nuclear accident in 1986. Therefore, in this study, the goal was to establish a mouse model of thyroid carcinogenesis, based on a standardized histological classification scheme for the murine thyroid tumors, and complemented by molecular genetic analyses.

In previous studies, radioiodine (I131, 111 kBq) was injected into iodine deficient fed mothers of various mouse strains (F1-hybrids and backcrosses of C57/BL6, C3H, BALB/c, and JF1). The first injection was applied during gestation and the second during lactation. The necropsy tissue was submitted for the analysis in this study.

A set of 365 thyroid glands (203 irradiated and 162 control mice) was histological examined following the current WHO classification of human thyroid tumors (2004) for comparative purposes. The irradiated mice showed 24 % of cases with simple hyperplasia (SH), 20 % with nodular hyperplasia (NH), 7 % with follicular thyroid adenoma (FTA), and 5 % with follicular thyroid carcinoma (FTC) whereas in the control group only 3 % SH, 3 % of NH, 1 % of FTA, and 1 % of FTC were observed. Interestingly, no PTC was diagnosed in the mice, which is the most frequent irradiation-related type of thyroid cancer in human. Therefore, the histological type of the radiation-associated thyroid tumors in mice differs from that in human. However, some cases of murine FTC presented PTC-like biological behavior. In addition to the significant increase of hyperplasias in irradiated mice, most of the FTC (82 %) arose amongst a background of hyperplastic nodules. Therefore, a progression from NH to FTC, based on genetic instability, cannot be ruled out.

The following molecular methods were used: PCR- (polymerase chain reaction-) based loss of heterozygosity (LOH), comparative genomic hybridization (CGH), and fluorescence-in-situ-hybridization (FISH). Since the CGH-study in mice using formalin-fixed paraffin-embedded tissue (FFPE) is not yet established, an important part of the study was dedicated to evaluate this methodology.

The LOH-study was performed with thyroid gland tissue from 40 mice (seven normal thyroid glands, 12 SH, 10 NH, 10 FTA, and one FTC) using 36 microsatellites for nine different loci.

With the exception of an LOH with a single microsatellite on chromosome 14 in 40 % of NH, LOH was found in 75 % of the irradiated male mice with H6F1-background on chromosomes 4, 5, 6, 11, 14, and / or 19. This suggests the existence of a mouse strain specific genetic predisposition, which influence on the genetic stability. One of the FTA (an atypical FTA) was highly suspicious for a deletion of the tumorsuppressorgene *Rb1* (supported by intragenic FISH-analysis), which could play an important role in the thyroid carcinogenesis.

For the CGH-study, thyroid tissue derived from 21 different mice (F2-hybrids) was analyzed (two normal thyroid glands, one SH, 12 NH, two FTA, and eight FTC). In 46 % of the hyperplasias, small chromosomal gains and losses located on different chromosomes were observed; suggesting that there exists a genetic instability, which may lead eventually to malignant progression. Regional polyploidies on chromosomes 4 and 5 were demonstrated in one of the FTAs, which could be a hint for the location of oncogenes. Taken together, in FTA development there is a broad spectrum of genetic alteration, and by inference mechanisms. In contrast, the FTC exhibited a significant increase of specific aneuploidies, mainly deletions of the chromosomes 4 (88 %), 9 (50 %), and 14 (38 %). Identical alterations of chromosomes 4 and 9 were also observed in the one case of an FTC from a non-irradiated mouse. These data indicate that irradiation, most probably, increases the frequency of genetic changes, but does not change the type of genetic alterations, which play a crucial role in thyroid carcinogenesis in mice.

A better understanding of molecular genetics involved in thyroid tumorigenesis in standardized mouse models may give insight into the pathogenesis of the various tumor types. Together with the results from human pathology and in vitro studies, this may lead to a better knowledge about the molecular pathways with diagnostic, prognostic, and therapeutic relevance. The results of this study demonstrate a morphological and genetical difference between human (PTC) and murine (FTC) radiation-associated thyroid tumors, but a strong similarity to the human follicular tumors. Therefore, this mouse model serves as a good model of carcinogenetic mechanisms, tumor induction, and progression in the human follicular tumors FTA and FTC, resulting from the cooperative effect of radioiodine exposition and iodine deficiency.

**VII. LITERATURVERZEICHNIS**

- Aldred MA, Huang Y, Liyanarachchi S, Pellegata NS, Gimm O, Jhiang S, Davuluri RV, de la Chapelle A, Eng C, 2004: Papillary and follicular thyroid carcinomas show distinctly different microarray expression profiles and can be distinguished by a minimum of five genes. *J Clin Oncol* 22:3531-9.
- Anwar F, Emond MJ, Schmidt RA, Hwang HC, Bronner MP, 2000: Retinoblastoma expression in thyroid neoplasms. *Mod Pathol* 13:562-9.
- Apel RL, Ezzat S, Bapat BV, Pan N, LiVolsi VA, Asa SL, 1995: Clonality of thyroid nodules in sporadic goiter. *Diagn Mol Pathol* 4:113-21.
- Arif S, Blanes A, Diaz-Cano SJ, 2002: Hashimoto's thyroiditis shares features with early papillary thyroid carcinoma. *Histopathology* 41:357-62.
- Ball E, Bond J, Franc B, Demicco C, Wynford-Thomas D, 2007: An immunohistochemical study of p16 (INK4a) expression in multistep thyroid tumorigenesis. *Eur J Cancer* 43:194-201.
- Baloch ZW und Livolsi VA, 2002: Follicular-patterned lesions of the thyroid: the bane of the pathologist. *Am J Clin Pathol* 117:143-50.
- Barrios L, Miro R, Caballin MR, Fuster C, Guedea F, Subias A, Egozcue J, 1989: Cytogenetic effects of radiotherapy. Breakpoint distribution in induced chromosome aberrations. *Cancer Genet Cytogenet* 41:61-70.
- Bartolazzi A, Gasbarri A, Papotti M, Bussolati G, Lucante T, Khan A, Inohara H, Marandino F, Orlandi F, Nardi F, Vecchione A, Tecce R, Larsson O, 2001: Application of an immunodiagnostic method for improving preoperative diagnosis of nodular thyroid lesions. *Lancet* 357:1644-50.
- Bartolazzi A und Bussolati G, 2006: Galectin-3 does not reliably distinguish benign from malignant thyroid neoplasms. *Histopathology* 48:212-3.
- Bauer AJ, Cavalli LR, Rone JD, Francis GL, Burch HB, Tuttle RM, Ringel MD, Stratakis CA, Haddad BR, 2002: Evaluation of adult papillary thyroid carcinomas by comparative genomic hybridization and microsatellite instability analysis. *Cancer Genet Cytogenet* 135:182-6.
- Baverstock K, Egloff B, Pinchera A, Ruchti C, Williams D, 1992: Thyroid cancer after Chernobyl. *Nature* 359:21-2.
- Beesley MF und McLaren KM, 2002: Cytokeratin 19 and galectin-3 immunohistochemistry in the differential diagnosis of solitary thyroid nodules. *Histopathology* 41:236-43.
- Belge G, Rippe V, Meiboom M, Drieschner N, Garcia E, Bullerdiek J, 2001: Delineation of a 150-kb breakpoint cluster in benign thyroid tumors with 19q13.4 aberrations. *Cytogenet Cell Genet* 93:48-51.
- Biancifiori C, 1979: Tumours of the thyroid gland. *IARC Sci Publ* 23:451-68.
- Bialy H, 2001: Aneuploidy and cancer--the vintage wine revisited. *Nat Biotechnol* 19:22-3.
- Blumenthal HT, 1955: Aging processes in the endocrine glands of various strains of normal mice: relationship of hypophyseal activity to aging changes in other endocrine glands. *J Gerontol* 10:253-67.
- Boltze C, Brabant G, Dralle H, Gerlach R, Roessner A, Hoang-Vu C, 2002: Radiation-induced thyroid carcinogenesis as a function of time and dietary iodine supply: an in vivo model of tumorigenesis in the rat. *Endocrinology* 143:2584-92.
- Boltze C, 2004: Animal models of thyroid carcinogenesis. *Cancer Treat Res* 122:273-93.



## VII. LITERATURVERZEICHNIS

- Boorman GA, 1997: Preneoplastic and neoplastic lesions of the rat and mouse thyroid. In: Bannasch P und Gössner, W: Pathology of neoplasia and preneoplasia in rodents (2). Schattauer, Stuttgart New York. 115-128.
- Boorman GA und Hardisty JF, 1999: Thyroid and parathyroid glands. In: Maronpot RR: Pathology of the mouse. 1. Ausgabe. Cache River Press Vienna, USA. 537-554
- Bounacer A, McGregor A, Skinner J, Bond J, Poghosyan Z, Wynford-Thomas D, 2004: Mutant ras-induced proliferation of human thyroid epithelial cells requires three effector pathways. *Oncogene* 23:7839-45.
- Brinkley BR und Goepfert TM, 1998: Supernumerary centrosomes and cancer: Boveri's hypothesis resurrected. *Cell Motil Cytoskeleton* 41:281-8.
- Cameron BR und Berean KW, 2003: Cytokeratin subtypes in thyroid tumours: immunohistochemical study with emphasis on the follicular variant of papillary carcinoma. *J Otolaryngol* 32:319-22.
- Capen C und Sagartz J, 1998: A ret transgenic mouse model of thyroid carcinogenesis. *Lab Anim Sci* 48:580-3.
- Capen C, 2001: Thyroid gland. In: Mohr U: International Classification of Rodent Tumors - the Mouse. WHO - International Agency for Research on Cancer. Springer, Berlin-Heidelberg. 269-323
- Capen C, 2002: Tumors, Hyperplasia, and Cysts of Thyroid Follicular Cells. In: Meuten D: Tumors in Domestic Animals. 4. Auflage. Iowa State Press, 638.
- Cardis E, Howe G, Ron E, Bebesko V, Bogdanova T, Bouville A, Carr Z, Chumak V, Davis S, Demidchik Y, Drozdovitch V, Gentner N, Gudzenko N, Hatch M, Ivanov V, Jacob P, Kapitonova E, Kenigsberg Y, Kesminiene A, Kopecky KJ, Kryuchkov V, Loos A, Pinchera A, Reiners C, Repacholi M, Shibata Y, Shore RE, Thomas G, Tirmarche M, Yamashita S, Zvonova I, 2006: Cancer consequences of the Chernobyl accident: 20 years on. *J Radiol Prot* 26:127-40.
- Casey MB, Lohse CM, Lloyd RV, 2003: Distinction between papillary thyroid hyperplasia and papillary thyroid carcinoma by immunohistochemical staining for cytokeratin 19, galectin-3, and HBME-1. *Endocr Pathol* 14:55-60.
- Castro P, Sansonetty F, Soares P, Dias A, Sobrinho-Simoes M, 2001: Fetal adenomas and minimally invasive follicular carcinomas of the thyroid frequently display a triploid or near triploid DNA pattern. *Virchows Arch* 438:336-42.
- Cerilli LA, Mills SE, Rumpel CA, Dudley TH, Moskaluk CA, 2002: Interpretation of RET immunostaining in follicular lesions of the thyroid. *Am J Clin Pathol* 118:186-93.
- Cerutti JM, Delcelo R, Amadei MJ, Nakabashi C, Maciel RM, Peterson B, Shoemaker J, Riggins GJ, 2004: A preoperative diagnostic test that distinguishes benign from malignant thyroid carcinoma based on gene expression. *J Clin Invest* 113:1234-42.
- Chen Y, Zhu M, Zhou X, Lin W, Ni C, Li F, Zhang S, Gong Z, 2002: [Expression of TTF-1 in thyroid tumors originating from follicular epithelium and its correlation with expression of RET, galectin-3 and mucin-1 genes]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 82:257-61.
- Cheung L, Messina M, Gill A, Clarkson A, Learoyd D, Delbridge L, Wentworth J, Philips J, Clifton-Bligh R, Robinson BG, 2003: Detection of the PAX8-PPAR gamma fusion oncogene in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 88:354-7.
- Cho JY, Sagartz JE, Capen CC, Mazzaferri EL, Jhiang SM, 1999: Early cellular abnormalities induced by RET/PTC1 oncogene in thyroid-targeted transgenic mice. *Oncogene* 18:3659-65.

## VII. LITERATURVERZEICHNIS

- Chung DH, Kang GH, Kim WH, Ro JY, 1999: Clonal analysis of a solitary follicular nodule of the thyroid with the polymerase chain reaction method. *Mod Pathol* 12:265-71.
- Chung YJ, Jonkers J, Kitson H, Fiegler H, Humphray S, Scott C, Hunt S, Yu Y, Nishijima I, Velds A, Holstege H, Carter N, Bradley A, 2004: A whole-genome mouse BAC microarray with 1-Mb resolution for analysis of DNA copy number changes by array comparative genomic hybridization. *Genome Res* 14:188-96.
- Classon M und Harlow E, 2002: The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat Rev Cancer* 2:910-7.
- Clifton KH, 1986: Thyroid cancer: Reevaluation of an experimental model for radiogenic endocrine carcinogenesis. In: Upton AC: *Radiation Carcinogenesis* (1). Elsevier,
- Coli A, Bigotti G, Zucchetti F, Negro F, Massi G, 2002: Galectin-3, a marker of well-differentiated thyroid carcinoma, is expressed in thyroid nodules with cytological atypia. *Histopathology* 40:80-7.
- Dahme E. und Weiss E., 1999: *Grundriß der speziellen pathologischen Anatomie der Haussäugetiere*. 5. Auflage, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 464-470
- DeLellis RA, 1993: Orphan Annie eye nuclei: a historical note. *Am J Surg Pathol* 17:1067-8.
- DeLellis RA, Williams ED, LiVolsi V, Baloch Z, Sobrinho-Simoes M, Fagin JA, Nikiforov YE, Santoro M, Eng C, Harach HR, 2004: Tumours of the thyroid and parathyroid. In: DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C: *World Health Organization (WHO) - Classification of Tumours: Pathology and Genetics: Tumours of Endocrine Organs*. IARC Press, Lyon. 49-133.
- Derwahl M, Broecker M, Kraiem Z, 1999: Clinical review 101: Thyrotropin may not be the dominant growth factor in benign and malignant thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 84:829-34.
- Detours V, Wattel S, Venet D, Hutsebaut N, Bogdanova T, Tronko MD, Dumont JE, Franc B, Thomas G, Maenhaut C, 2005: Absence of a specific radiation signature in post-Chernobyl thyroid cancers. *Br J Cancer* 92:1545-52.
- Devilee P, Cleton-Jansen AM, Cornelisse CJ, 2001: Ever since Knudson. *Trends Genet* 17:569-73.
- Di Cristofano A, Pesce B, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP, 1998: Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat Genet* 19:348-55.
- Doniach I, 1963: Effects Including Carcinogenesis of I-131 and X-Rays on the Thyroid of Experimental Animals: a Review. *Health Phys* 9:1357-62.
- Draghici S. 2003: *Data Analysis Tools for Microarrays*. Aus: Hall C: *Mathematical Biology and Medicine Series*. CRC Press Boca Raton - New York.
- Duesberg P und Rasnick D, 2000: Aneuploidy, the somatic mutation that makes cancer a species of its own. *Cell Motil Cytoskeleton* 47:81-107.
- Duesberg P und Li R, 2003: Multistep carcinogenesis: a chain reaction of aneuploidizations. *Cell Cycle* 2:202-10.
- Duesberg P, 2005: Does aneuploidy or mutation start cancer? *Science* 307:41.
- Dwight T, Thoppe SR, Foukakis T, Lui WO, Wallin G, Hoog A, Frisk T, Larsson C, Zedenius J, 2003: Involvement of the PAX8/peroxisome proliferator-activated receptor gamma rearrangement in follicular thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 88:4440-5.

## VII. LITERATURVERZEICHNIS

- Erklic S und Kocer NE, 2005: The Role of Cytokeratin 19 in the Differential Diagnosis of True Papillary Carcinoma of Thyroid and Papillary Carcinoma-like Changes in Graves' Disease. *Endocr Pathol* 16:63-6.
- Faggiano A, Coulot J, Bellon N, Talbot M, Caillou B, Ricard M, Bidart JM, Schlumberger M, 2004: Age-dependent variation of follicular size and expression of iodine transporters in human thyroid tissue. *J Nucl Med* 45:232-7.
- Fagin JA, Matsuo K, Karmakar A, Chen DL, Tang SH, Koeffler HP, 1993: High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas. *J Clin Invest* 91:179-84.
- Fagin JA, 2002: Perspective: lessons learned from molecular genetic studies of thyroid cancer--insights into pathogenesis and tumor-specific therapeutic targets. *Endocrinology* 143:2025-8.
- Farid NR, Shi Y, Zou M, 1994: Molecular basis of thyroid cancer. *Endocr Rev* 15:202-32.
- Fearon ER und Vogelstein B, 1990: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61:759-67.
- Fiegler H, Gribble SM, Burford DC, Carr P, Prigmore E, Porter KM, Clegg S, Crolla JA, Dennis NR, Jacobs P, Carter NP, 2003: Array painting: a method for the rapid analysis of aberrant chromosomes using DNA microarrays. *J Med Genet* 40:664-70.
- Fijneman RJ, 2005: Genetic predisposition to sporadic cancer: how to handle major effects of minor genes? *Cell Oncol* 27:281-92.
- Fink A, Tomlinson G, Freeman JL, Rosen IB, Asa SL, 1996: Occult micropapillary carcinoma associated with benign follicular thyroid disease and unrelated thyroid neoplasms. *Mod Pathol* 9:816-20.
- Finn SP, Smyth P, O'Regan E, Cahill S, Flavin R, O'Leary J, Sheils O, 2004: Array comparative genomic hybridisation analysis of gamma-irradiated human thyrocytes. *Virchows Arch* 445:396-404.
- Fischer AH, Taysavang P, Jhiang SM, 2003: Nuclear envelope irregularity is induced by RET/PTC during interphase. *Am J Pathol* 163:1091-100.
- Foster HLS und Fox JD, 1982: Thyroid tumors. *In: Foster HLS und Fox, JD: The mouse biomedical research: Experimental biology and oncology* (4). Academic press, New York. 471f.
- Frith CH und Heath JE, 1984: Morphological classification and incidence of thyroid tumors in untreated aged mice. *J Gerontol* 39:7-10.
- Fusco A, Chiappetta G, Hui P, Garcia-Rostan G, Golden L, Kinder BK, Dillon DA, Giuliano A, Cirafici AM, Santoro M, Rosai J, Tallini G, 2002: Assessment of RET/PTC oncogene activation and clonality in thyroid nodules with incomplete morphological evidence of papillary carcinoma: a search for the early precursors of papillary cancer. *Am J Pathol* 160:2157-67.
- Fusco A, Viglietto G, Santoro M, 2005: A new mechanism of BRAF activation in human thyroid papillary carcinomas. *J Clin Invest* 115:20-3.
- Garinis GA, Patrinos GP, Spanakis NE, Menounos PG, 2002: DNA hypermethylation: when tumour suppressor genes go silent. *Hum Genet* 111:115-27.
- Gérard AC, Deneuf JF, Colin IM, van den Hove MF, 2004: Evidence for processing of compact insoluble thyroglobulin globules in relation with follicular cell functional activity in the human and the mouse thyroid. *Eur J Endocrinol* 150:73-80.
- Gerber H, Huber G, Peter HJ, Kampf J, Lemarchand-Beraud T, Fragu P, Stocker R, 1994: Transformation of normal thyroids into colloid goiters in rats and mice by diphenylthiohydantoin. *Endocrinology* 135:2688-99.

## VII. LITERATURVERZEICHNIS

- Gimm O, Perren A, Weng LP, Marsh DJ, Yeh JJ, Ziebold U, Gil E, Hinze R, Delbridge L, Lees JA, Mutter GL, Robinson BG, Komminoth P, Dralle H, Eng C, 2000: Differential nuclear and cytoplasmic expression of PTEN in normal thyroid tissue, and benign and malignant epithelial thyroid tumors. *Am J Pathol* 156:1693-700.
- Giordano TJ, Kuick R, Thomas DG, Misek DE, Vinco M, Sanders D, Zhu Z, Ciampi R, Roh M, Shedden K, Gauger P, Doherty G, Thompson NW, Hanash S, Koenig RJ, Nikiforov YE, 2005: Molecular classification of papillary thyroid carcinoma: distinct BRAF, RAS, and RET/PTC mutation-specific gene expression profiles discovered by DNA microarray analysis. *Oncogene* 24:6646-56.
- Gould E, Watzak L, Chamizo W, Albores-Saavedra J, 1989: Nuclear grooves in cytologic preparations. A study of the utility of this feature in the diagnosis of papillary carcinoma. *Acta Cytol* 33:16-20.
- Hackett CS, Hodgson JG, Law ME, Fridlyand J, Osoegawa K, de Jong PJ, Nowak NJ, Pinkel D, Albertson DG, Jain A, Jenkins R, Gray JW, Weiss WA, 2003: Genome-wide array CGH analysis of murine neuroblastoma reveals distinct genomic aberrations which parallel those in human tumors. *Cancer Res* 63:5266-73.
- Hanahan D und Weinberg RA, 2000: The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.
- Hapke MR und Dehner LP, 1979: The optically clear nucleus. A reliable sign of papillary carcinoma of the thyroid? *Am J Surg Pathol* 3:31-8.
- Harrer P, Broecker M, Zint A, Schatz H, Zumtobel V, Derwahl M, 1998: Thyroid nodules in recurrent multinodular goiters are predominantly polyclonal. *J Endocrinol Invest* 21:380-5.
- Hedinger C, Williams ED, Sobin LH, 1988: Histological Typing of Thyroid Tumours. WHO - International Histological Classification of Tumours. Band 11. Springer-Verlag Heidelberg-Berlin
- Hemmer S, Wasenius VM, Knuutila S, Joensuu H, Franssila K, 1998: Comparison of benign and malignant follicular thyroid tumours by comparative genomic hybridization. *Br J Cancer* 78:1012-7.
- Hemmer S, Wasenius VM, Knuutila S, Franssila K, Joensuu H, 1999: DNA copy number changes in thyroid carcinoma. *Am J Pathol* 154:1539-47.
- Herrmann MA, Hay ID, Bartelt DH, Jr., Ritland SR, Dahl RJ, Grant CS, Jenkins RB, 1991: Cytogenetic and molecular genetic studies of follicular and papillary thyroid cancers. *J Clin Invest* 88:1596-604.
- Hill RN, Erdreich LS, Paynter OE, Roberts PA, Rosenthal SL, Wilkinson CF, 1989: Thyroid follicular cell carcinogenesis. *Fundam Appl Toxicol* 12:629-97.
- Hillidge CJ, Sanecki RK, Theodorakis MC, 1982: Thyroid carcinoma in a horse. *J Am Vet Med Assoc* 181:711-4.
- Hirokawa M, Carney JA, Goellner JR, DeLellis RA, Heffess CS, Katoh R, Tsujimoto M, Kakudo K, 2002: Observer variation of encapsulated follicular lesions of the thyroid gland. *Am J Surg Pathol* 26:1508-14.
- Hodgson G, Hager JH, Volik S, Hariono S, Wernick M, Moore D, Nowak N, Albertson DG, Pinkel D, Collins C, Hanahan D, Gray JW, 2001: Genome scanning with array CGH delineates regional alterations in mouse islet carcinomas. *Nat Genet* 29:459-64.
- Hunt JL, Livolsi VA, Baloch ZW, Swalsky PA, Bakker A, Sasatomi E, Finkelstein S, Barnes EL, 2003: A novel microdissection and genotyping of follicular-derived thyroid tumors to predict aggressiveness. *Hum Pathol* 34:375-80.

## VII. LITERATURVERZEICHNIS

- Hunt JL, Fowler M, Lomago D, Niehouse L, Sasatomi E, Swalsky P, Finkelstein S, 2004: Tumor suppressor gene allelic loss profiles of the variants of papillary thyroid carcinoma. *Diagn Mol Pathol* 13:41-6.
- Hyman E, Kauraniemi P, Hautaniemi S, Wolf M, Mousses S, Rozenblum E, Ringner M, Sauter G, Monni O, Elkahloun A, Kallioniemi OP, Kallioniemi A., 2002: Impact of DNA amplification on gene expression patterns in breast cancer. *Cancer Res.* 62(21):6240-5.
- Ilyinskikh NN, Ilyinskikh IN, Ilyinskikh EN, 1999: Chromosome breakage at sites of oncogenes in a population accidentally exposed to radioactive chemical pollution. *Mutagenesis* 14:83-6.
- Inohara H, Honjo Y, Yoshii T, Akahani S, Yoshida J, Hattori K, Okamoto S, Sawada T, Raz A, Kubo T, 1999: Expression of galectin-3 in fine-needle aspirates as a diagnostic marker differentiating benign from malignant thyroid neoplasms. *Cancer* 85:2475-84.
- Jacks T, Fazeli A, Schmitt EM, Bronson RT, Goodell MA, Weinberg RA, 1992: Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature* 359:295-300.
- Jacob P, Bogdanova TI, Buglova E, Chepurnyi M, Demidchik Y, Gavrillin Y, Kenigsberg J, Meckbach R, Schotola C, Shinkarev S, Tronko MD, Ulanovsky A, Vavilov S, Walsh L, 2006: Thyroid cancer risk in areas of Ukraine and Belarus affected by the Chernobyl accident. *Radiat Res* 165:1-8.
- Jhiang SM, Sagartz JE, Tong Q, Parker-Thornburg J, Capen CC, Cho JY, Xing S, Ledent C, 1996: Targeted expression of the ret/PTC1 oncogene induces papillary thyroid carcinomas. *Endocrinology* 137:375-8.
- Johnson NA, Hamoudi RA, Ichimura K, Liu L, Pearson DM, Collins VP, Du MQ, 2006: Application of array CGH on archival formalin-fixed paraffin-embedded tissues including small numbers of microdissected cells. *Lab Invest* 86:968-78.
- Jokinen MP und Botts S, 1994: Tumours of the thyroid gland. In: Turusov V und Mohr U: Pathology of Tumours in Laboratory Animals (2). IARC scientific publications No.111, Lyon.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D, 1992: Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258:818-21.
- Kawachi K, Matsushita Y, Yonezawa S, Nakano S, Shirao K, Natsugoe S, Sueyoshi K, Aikou T, Sato E, 2000: Galectin-3 expression in various thyroid neoplasms and its possible role in metastasis formation. *Hum Pathol* 31:428-33.
- Kessler M., Smeak D., 2002: Kleintieronkologie - Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hunden und Katzen. Parey Buchverlag Berlin
- Kimmel RR, Zhao LP, Nguyen D, Lee S, Aronszajn M, Cheng C, Troshin VP, Abrosimov A, Delrow J, Tuttle RM, Tsyb AF, Kopecky KJ, Davis S, Neiman PE, 2006: Microarray comparative genomic hybridization reveals genome-wide patterns of DNA gains and losses in post-Chernobyl thyroid cancer. *Radiat Res* 166:519-31.
- Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA, 2003: High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 63:1454-7.
- Kitamura Y, Shimizu K, Ito K, Tanaka S, Emi M, 2001: Allelotyping of follicular thyroid carcinoma: frequent allelic losses in chromosome arms 7q, 11p, and 22q. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4268-72.
- Klugbauer S, Jauch A, Lengfelder E, Demidchik E, Rabes HM, 2000: A novel type of RET rearrangement (PTC8) in childhood papillary thyroid carcinomas and characterization of the involved gene (RFG8). *Cancer Res* 60:7028-32.

## VII. LITERATURVERZEICHNIS

- Knauf JA, Ma X, Smith EP, Zhang L, Mitsutake N, Liao XH, Refetoff S, Nikiforov YE, Fagin JA, 2005: Targeted expression of BRAFV600E in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation. *Cancer Res* 65:4238-45.
- Knudson AG Jr., 1971: Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68:820-3.
- Komarova NL, Sengupta A, Nowak MA, 2003: Mutation-selection networks of cancer initiation: tumor suppressor genes and chromosomal instability. *J Theor Biol* 223:433-50.
- Kreienbrock L. und Schach S., 2000: Epidemiologische Methoden. 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin
- Krohn K, Reske A, Ackermann F, Muller A, Paschke R, 2001: Ras mutations are rare in solitary cold and toxic thyroid nodules. *Clin Endocrinol (Oxf)* 55:241-8.
- Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, Chen CJ, Mueller E, Spiegelman BM, Fletcher JA, 2000: PAX8-PPARgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected]. *Science* 289:1357-60.
- La Perle KM, Jhiang SM, Capen CC, 2000: Loss of p53 promotes anaplasia and local invasion in ret/PTC1-induced thyroid carcinomas. *Am J Pathol* 157:671-7.
- Ledent C, Parmentier M, Vassart G, 1990: Tissue-specific expression and methylation of a thyroglobulin-chloramphenicol acetyltransferase fusion gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:6176-80.
- Ledent C, Dumont JE, Vassart G, Parmentier M, 1992: Thyroid expression of an A2 adenosine receptor transgene induces thyroid hyperplasia and hyperthyroidism. *Embo J* 11:537-42.
- Ledent C, Marcotte A, Dumont JE, Vassart G, Parmentier M, 1995: Differentiated carcinomas develop as a consequence of the thyroid specific expression of a thyroglobulin-human papillomavirus type 16 E7 transgene. *Oncogene* 10:1789-97.
- Lee W, Chiacchierini RP, Shleien B, Telles NC, 1982: Thyroid tumors following 131I or localized X irradiation to the thyroid and pituitary glands in rats. *Radiat Res* 92:307-19.
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, 1998: Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396:643-9.
- Lima J, Trovisco V, Soares P, Maximo V, Magalhaes J, Salvatore G, Santoro M, Bogdanova T, Tronko M, Abrosimov A, Jeremiah S, Thomas G, Williams D, Sobrinho-Simoes M, 2004: BRAF mutations are not a major event in post-Chernobyl childhood thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 89:4267-71.
- Lindsay S und Chaikoff IL, 1964: The Effects of Irradiation on the Thyroid Gland with Particular Reference to the Induction of Thyroid Neoplasms. *Cancer Res* 24:1099-107.
- Lindsay S, Nichols CW, Jr., Chaikoff IL, 1968: Carcinogenic effect of irradiation. Low doses of radioactive iodine on the thyroid gland of the rat and mouse. *Arch Pathol* 85:487-92.
- Lloyd RV, Erickson LA, Casey MB, Lam KY, Lohse CM, Asa SL, Chan JK, DeLellis RA, Harach HR, Kakudo K, LiVolsi VA, Rosai J, Sebo TJ, Sobrinho-Simoes M, Wenig BM, Lae ME, 2004: Observer variation in the diagnosis of follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *Am J Surg Pathol* 28:1336-40.
- Löffler G., 1999: Biochemie und Pathobiochemie des endokrinen Systems. In *Basiswissen der Biochemie mit Pathobiochemie*. 3. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg-Berlin, 468-473
- Ludvikova M, Holubec L, Jr., Ryska A, Topolcan O, 2005: Proliferative markers in diagnosis of thyroid tumors: a comparative study of MIB-1 and topoisomerase II-a immunostaining. *Anticancer Res* 25:1835-40.

## VII. LITERATURVERZEICHNIS

- Maddison K und Clarke AR, 2005: New approaches for modelling cancer mechanisms in the mouse. *J Pathol* 205:181-93.
- Mai KT, Landry DC, Thomas J, Burns BF, Commons AS, Yazdi HM, Odell PF, 2001: Follicular adenoma with papillary architecture: a lesion mimicking papillary thyroid carcinoma. *Histopathology* 39:25-32.
- Marques AR, Espadinha C, Catarino AL, Moniz S, Pereira T, Sobrinho LG, Leite V, 2002: Expression of PAX8-PPAR gamma 1 rearrangements in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3947-52.
- Martins L, Matsuo SE, Ebina KN, Kulcsar MA, Friguglietti CU, Kimura ET, 2002: Galectin-3 messenger ribonucleic acid and protein are expressed in benign thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4806-10.
- Mazzanti C, Zeiger MA, Costouros NG, Umbricht C, Westra WH, Smith D, Somervell H, Bevilacqua G, Alexander HR, Libutti SK, Costourous N, 2004: Using gene expression profiling to differentiate benign versus malignant thyroid tumors. *Cancer Res* 64:2898-903.
- Mehrotra P, Okpokam A, Bouhaidar R, Johnson SJ, Wilson JA, Davies BR, Lennard TW, 2004: Galectin-3 does not reliably distinguish benign from malignant thyroid neoplasms. *Histopathology* 45:493-500.
- Mehrotra P, Gonzalez MA, Johnson SJ, Coleman N, Wilson JA, Davies BR, Lennard TW, 2006: Mcm-2 and Ki-67 have limited potential in preoperative diagnosis of thyroid malignancy. *Laryngoscope* 116:1434-8.
- Melillo RM, Castellone MD, Guarino V, De Falco V, Cirafici AM, Salvatore G, Caiazzo F, Basolo F, Giannini R, Kruhoffer M, Orntoft T, Fusco A, Santoro M, 2005: The RET/PTC-RAS-BRAF linear signaling cascade mediates the motile and mitogenic phenotype of thyroid cancer cells. *J Clin Invest* 115:1068-81.
- Michiels FM, Caillou B, Talbot M, Dessarps-Freichay F, Maunoury MT, Schlumberger M, Mercken L, Monier R, Feunteun J, 1994: Oncogenic potential of guanine nucleotide stimulatory factor alpha subunit in thyroid glands of transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10488-92.
- Mizuno T, Iwamoto KS, Kyoizumi S, Nagamura H, Shinohara T, Koyama K, Seyama T, Hamatani K, 2000: Preferential induction of RET/PTC1 rearrangement by X-ray irradiation. *Oncogene* 19:438-43.
- Monaco C, Califano D, Chiappetta G, Mineo A, De Francis V, Vecchio G, Santelli G, 1995: Mutated human Kirsten ras, driven by a thyroglobulin promoter, induces a growth advantage and partially dedifferentiates rat thyroid epithelial cells in vitro. *Int J Cancer* 63:757-60.
- Moniz S, Catarino AL, Marques AR, Cavaco B, Sobrinho L, Leite V, 2002: Clonal origin of non-medullary thyroid tumours assessed by non-random X-chromosome inactivation. *Eur J Endocrinol* 146:27-33.
- Morse HC, Anver MR, Fredrickson TN, Haines DC, Harris AW, Harris NL, Jaffe ES, Kogan SC, MacLennan IC, Pattengale PK, Ward JM, 2002: Bethesda proposals for classification of lymphoid neoplasms in mice. *Blood* 100:246-58.
- Naganuma H, Murayama H, Ohtani N, Takaya K, Mori Y, Sakai N, Kakudo K, 2000: Optically clear nuclei in papillary carcinoma of the thyroid: demonstration of one of the fixation artifacts and its practical usefulness. *Pathol Int* 50:113-8.
- Nakahara S, Oka N, Raz A, 2005: On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. *Apoptosis* 10:267-75.
- Namba H, Rubin SA, Fagin JA, 1990: Point mutations of ras oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis. *Mol Endocrinol* 4:1474-9.

## VII. LITERATURVERZEICHNIS

- Nelson RW und Couto CG, 2003: Disorders of the thyroid gland. *In*: Small animal internal medicine. 3. Auflage, Mosby Verlag, St. Louis, Missouri, 691-728
- Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, Zhu Z, Giannini R, Salvatore G, Fusco A, Santoro M, Fagin JA, Nikiforov YE, 2003: BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 88:5399-404.
- Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, Alexander EK, Dorn GW, 2nd, Tallini G, Kroll TG, Nikiforov YE, 2003: RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2318-26.
- Nikiforova MN, Ciampi R, Salvatore G, Santoro M, Gandhi M, Knauf JA, Thomas GA, Jeremiah S, Bogdanova TI, Tronko MD, Fagin JA, Nikiforov YE, 2004: Low prevalence of BRAF mutations in radiation-induced thyroid tumors in contrast to sporadic papillary carcinomas. *Cancer Lett* 209:1-6.
- Nikitin AY, Alcaraz A, Anver MR, Bronson RT, Cardiff RD, Dixon D, Fraire AE, Gabrielson EW, Gunning WT, Haines DC, Kaufman MH, Linnoila RI, Maronpot RR, Rabson AS, Reddick RL, Rehm S, Rozengurt N, Schuller HM, Schmidt EN, Travis WD, Ward JM, Jacks T, 2004: Classification of proliferative pulmonary lesions of the mouse: recommendations of the mouse models of human cancers consortium. *Cancer Res* 64:2307-16.
- Nowell PC, 2002: Tumor progression: a brief historical perspective. *Semin Cancer Biol* 12:261-6.
- Oostlander AE, Meijer GA, Ylstra B, 2004: Microarray-based comparative genomic hybridization and its applications in human genetics. *Clin Genet* 66:488-95.
- Oriola J, Halperin I, Mallofre C, Muntane J, Angel M, Rivera-Fillat F, 2001: Screening of selected genomic areas potentially involved in thyroid neoplasms. *Eur J Cancer* 37:2470-4.
- Osoegawa K, Tateno M, Woon PY, Frengen E, Mammoser AG, Catanese JJ, Hayashizaki Y, de Jong PJ, 2000: Bacterial artificial chromosome libraries for mouse sequencing and functional analysis. *Genome Res* 10:116-28.
- Ouyang B, Knauf JA, Ain K, Nacev B, Fagin JA, 2002: Mechanisms of aneuploidy in thyroid cancer cell lines and tissues: evidence for mitotic checkpoint dysfunction without mutations in BUB1 and BUBR1. *Clin Endocrinol (Oxf)* 56:341-50.
- Pacini F, Vorontsova T, Molinaro E, Shavrova E, Agate L, Kuchinskaya E, Elisei R, Demidchik EP, Pinchera A, 1999: Thyroid consequences of the Chernobyl nuclear accident. *Acta Paediatr Suppl* 88:23-7.
- Papotti M, Rodriguez J, Pompa RD, Bartolazzi A, Rosai J, 2005: Galectin-3 and HBME-1 expression in well-differentiated thyroid tumors with follicular architecture of uncertain malignant potential. *Mod Pathol* 18:541-6.
- Piccoli A, 1966: Mandibular metastases of papillary adenoma of the thyroid. *Clin Otorinolaringoiatr* 18:130-45.
- Pierotti MA, 2001: Chromosomal rearrangements in thyroid carcinomas: a recombination or death dilemma. *Cancer Lett* 166:1-7.
- Piersanti M, Ezzat S, Asa SL, 2003: Controversies in papillary microcarcinoma of the thyroid. *Endocr Pathol* 14:183-91.
- Pihan GA und Doxsey SJ, 1999: The mitotic machinery as a source of genetic instability in cancer. *Semin Cancer Biol* 9:289-302.
- Pihan G und Doxsey SJ, 2003: Mutations and aneuploidy: co-conspirators in cancer? *Cancer Cell* 4:89-94.



## VII. LITERATURVERZEICHNIS

- Pollack JR, Sorlie T, Perou CM, Rees CA, Jeffrey SS, Lonning PE, Tibshirani R, Botstein D, Borresen-Dale AL, Brown PO. 2002: Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors. *Proc Natl Acad Sci* 1;99(20):12963-8.
- Powell DJ, Jr., Russell J, Nibu K, Li G, Rhee E, Liao M, Goldstein M, Keane WM, Santoro M, Fusco A, Rothstein JL, 1998: The RET/PTC3 oncogene: metastatic solid-type papillary carcinomas in murine thyroids. *Cancer Res* 58:5523-8.
- Powell Jr DJ, Russell JP, Li G, Kuo BA, Fidanza V, Huebner K, Rothstein JL, 2001: Altered gene expression in immunogenic poorly differentiated thyroid carcinomas from RET/PTC3p53<sup>-/-</sup> mice. *Oncogene* 20:3235-46.
- Prasad ML, Pellegata NS, Huang Y, Nagaraja HN, Chapelle Ad A, Kloos RT, 2004: Galectin-3, fibronectin-1, CITED-1, HBME1 and cytokeratin-19 immunohistochemistry is useful for the differential diagnosis of thyroid tumors. *Mod Pathol*.
- Ragione FD und Iolascon A, 1997: Inactivation of cyclin-dependent kinase inhibitor genes and development of human acute leukemias. *Leuk Lymphoma*. 25(1-2):23-35
- Rangarajan A und Weinberg RA, 2003: Opinion: Comparative biology of mouse versus human cells: modelling human cancer in mice. *Nat Rev Cancer* 3:952-9.
- Rehm S, Nitsche B, Deerberg F, 1985: Non-neoplastic lesions of female virgin Han:NMRI mice, incidence and influence of food restriction throughout life span. I: Thyroid. *Lab Anim* 19:214-23.
- Reynolds L, Jones K, Winton DJ, Cranston A, Houghton C, Howard L, Ponder BA, Smith DP, 2001: C-cell and thyroid epithelial tumours and altered follicular development in transgenic mice expressing the long isoform of MEN 2A RET. *Oncogene* 20:3986-94.
- Richter H, Braselmann H, Hieber L, Thomas G, Bogdanova T, Tronko N, Zitzelsberger H, 2004: Chromosomal imbalances in post-chernobyl thyroid tumors. *Thyroid* 14:1061-4.
- Robbins J und Schneider AB, 2000: Thyroid cancer following exposure to radioactive iodine. *Rev Endocr Metab Disord* 1:197-203.
- Robbins J, Dunn JT, Bouville A, Kravchenko VI, Lubin J, Petrenko S, Sullivan KM, Vanmiddlesworth L, Wolff J, 2001: Iodine nutrition and the risk from radioactive iodine: a workshop report in the chernobyl long-term follow-up study. *Thyroid* 11:487-91.
- Romeis B., 1989: *Mikroskopische Technik*. München. Peter Böck ed. Urban & Schwarzenberg.
- Romero RL, Juston AC, Ballantyne J, Henry BE, 1997: The applicability of formalin-fixed and formalin fixed paraffin embedded tissues in forensic DNA analysis. *J Forensic Sci* 42:708-14.
- Ron E, Lubin JH, Shore RE, Mabuchi K, Modan B, Pottern LM, Schneider AB, Tucker MA, Boice JD, 1995: Thyroid cancer after exposure to external radiation: a pooled analysis of seven studies. *Radiat Res* 141:259-77
- Roque L, Rodrigues R, Pinto A, Moura-Nunes V, Soares J, 2003: Chromosome imbalances in thyroid follicular neoplasms: a comparison between follicular adenomas and carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 36:292-302.
- Rosai J, 2003: Immunohistochemical markers of thyroid tumors: significance and diagnostic applications. *Tumori* 89:517-9.
- Rosai J, LiVolsi VA, Sobrinho-Simoes M, Williams ED, 2003: Renaming papillary microcarcinoma of the thyroid gland: the Porto proposal. *Int J Surg Pathol* 11:249-51.

## VII. LITERATURVERZEICHNIS

- Rosai J, 2004: Thyroid gland. *In*: J. R: Rosai & Ackerman's Surgical Pathology (Band 1). 9. Auflage. Elsevier Books Mosby, London. 515-594.
- Russell JP, Powell DJ, Cunnane M, Greco A, Portella G, Santoro M, Fusco A, Rothstein JL, 2000: The TRK-T1 fusion protein induces neoplastic transformation of thyroid epithelium. *Oncogene* 19:5729-35.
- Rybakov SJ, Komissarenko IV, Tronko ND, Kvachenyuk AN, Bogdanova TI, Kovalenko AE, Bolgov MY, 2000: Thyroid cancer in children of Ukraine after the Chernobyl accident. *World J Surg* 24:1446-9.
- Sagartz JE, Jhiang SM, Tong Q, Capen CC, 1997: Thyroid-stimulating hormone promotes growth of thyroid carcinomas in transgenic mice with targeted expression of the ret/PTC1 oncogene. *Lab Invest* 76:307-18.
- Saggiorato E, Aversa S, Deandreis D, Arecco F, Mussa A, Puligheddu B, Cappia S, Conticello S, Papotti M, Orlandi F, 2004: Galectin-3: presurgical marker of thyroid follicular epithelial cell-derived carcinomas. *J Endocrinol Invest* 27:311-7.
- Saggiorato E, De Pompa R, Volante M, Cappia S, Arecco F, Dei Tos AP, Orlandi F, Papotti M, 2005: Characterization of thyroid 'follicular neoplasms' in fine-needle aspiration cytological specimens using a panel of immunohistochemical markers: a proposal for clinical application. *Endocr Relat Cancer* 12:305-17.
- Salabè GB, 2001: Pathogenesis of thyroid nodules: histological classification? *Biomed Pharmacother* 55:39-53.
- Sander S, Bullinger L, Karlsson A, Giuriato S, Hernandez-Boussard T, Felsher DW, Pollack JR, 2005: Comparative genomic hybridization on mouse cDNA microarrays and its application to a murine lymphoma model. *Oncogene* 24:6101-7.
- Sankaranarayanan K und Wassom JS, 2005: Ionizing radiation and genetic risks XIV. Potential research directions in the post-genome era based on knowledge of repair of radiation-induced DNA double-strand breaks in mammalian somatic cells and the origin of deletions associated with human genomic disorders. *Mutat Res* 578:333-70.
- Santelli G, de Franciscis V, Portella G, Chiappetta G, D'Alessio A, Califano D, Rosati R, Mineo A, Monaco C, Manzo G, et al., 1993: Production of transgenic mice expressing the Ki-ras oncogene under the control of a thyroglobulin promoter. *Cancer Res* 53:5523-7.
- Santoro M, Chiappetta G, Cerrato A, Salvatore D, Zhang L, Manzo G, Picone A, Portella G, Santelli G, Vecchio G, Fusco A, 1996: Development of thyroid papillary carcinomas secondary to tissue-specific expression of the RET/PTC1 oncogene in transgenic mice. *Oncogene* 12:1821-6.
- Santoro M, Melillo RM, Carlomagno F, Fusco A, Vecchio G, 2002: Molecular mechanisms of RET activation in human cancer. *Ann N Y Acad Sci* 963:116-21.
- Sarasin A, Bounacer A, Lepage F, Schlumberger M, Suarez HG, 1999: Mechanisms of mutagenesis in mammalian cells. Application to human thyroid tumours. *C R Acad Sci III* 322:143-9.
- Schaller RT und Stevenson JK, 1966: Development of carcinoma of the thyroid in iodine-deficient mice. *Cancer* 19:1063-80.
- Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD, Gerdes J, 1993: The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol* 123:513-22.
- Schmid KW und Farid NR, 2006: How to define follicular thyroid carcinoma? *Virchows Arch* 448:385-393.
- Segev DL, Umbricht C, Zeiger MA, 2003: Molecular pathogenesis of thyroid cancer. *Surg Oncol* 12:69-90.

## VII. LITERATURVERZEICHNIS

- Shattuck TM, Westra WH, Ladenson PW, Arnold A, 2005: Independent clonal origins of distinct tumor foci in multifocal papillary thyroid carcinoma. *N Engl J Med* 352:2406-12.
- Sherr CJ, 1996: Cancer cell cycles. *Science* 274:1672-7.
- Sherr CJ und McCormick F, 2002: The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2:103-12.
- Sherr CJ, 2004: Principles of tumor suppression. *Cell* 116:235-46.
- Shi X, Li J, Li A, Lv S, Xu G, 2006: Simultaneous analysis of microsatellite instability and loss of heterozygosity by capillary electrophoresis with a homemade kit. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*.
- Shi YF, Zou MJ, Schmidt H, Juhasz F, Stensky V, Robb D, Farid NR, 1991: High rates of ras codon 61 mutation in thyroid tumors in an iodide-deficient area. *Cancer Res* 51:2690-3.
- Shin E, Chung WY, Yang WI, Park CS, Hong SW, 2005: RET/PTC and CK19 expression in papillary thyroid carcinoma and its clinicopathologic correlation. *J Korean Med Sci* 20:98-104.
- Shore RE, Hildreth N, Dvoretzky P, Andresen E, Moseson M, Pasternack B, 1993: Thyroid cancer among persons given X-ray treatment in infancy for an enlarged thymus gland. *Am J Epidemiol* 137:1068-80.
- Shore RE, Hildreth N, Dvoretzky P, Pasternack B, Andresen E, 1993: Benign thyroid adenomas among persons X-irradiated in infancy for enlarged thymus glands. *Radiat Res* 134:217-23.
- Sieben NL, ter Haar NT, Cornelisse CJ, Fleuren GJ, Cleton-Jansen AM, 2000: PCR artifacts in LOH and MSI analysis of microdissected tumor cells. *Hum Pathol* 31:1414-9.
- Silbernagl S und Despopoulus A, 1991: Endokrines System und Hormone. *In: Taschenatlas der Physiologie*, 4. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 232-271
- Slebozinski A, 1994: Schilddrüse. *In: Döcke F: Veterinärmedizinische Endokrinologie*. 3. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Jena-Stuttgart, 228-268
- Slye M, Holmes HF, Wells HG, 1926: Studies in the incidence and inheritability of spontaneous thyroid tumors in mice. *J Cancer Res*. 10:175-194
- Snijders AM, Nowak N, Segraves R, Blackwood S, Brown N, Conroy J, Hamilton G, Hindle AK, Huey B, Kimura K, Law S, Myambo K, Palmer J, Ylstra B, Yue JP, Gray JW, Jain AN, Pinkel D, Albertson DG, 2001: Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nat Genet* 29:263-4.
- Soares P, dos Santos NR, Seruca R, Lothe RA, Sobrinho-Simoes M, 1997: Benign and malignant thyroid lesions show instability at microsatellite loci. *Eur J Cancer* 33:293-6.
- Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Lima J, Castro P, Preto A, Maximo V, Botelho T, Seruca R, Sobrinho-Simoes M, 2003: BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene* 22:4578-80.
- Sobrinho-Simoes M, Preto A, Rocha AS, Castro P, Maximo V, Fonseca E, Soares P, 2005: Molecular pathology of well-differentiated thyroid carcinomas. *Virchows Arch* 447:787-93.
- Stark GR, 1993: Regulation and mechanisms of mammalian gene amplification. *Adv Cancer Res* 61:87-113.
- Studer H und Derwahl M, 1995: Mechanisms of nonneoplastic endocrine hyperplasia--a changing concept: a review focused on the thyroid gland. *Endocr Rev* 16:411-26.
- Sugg SL, Ezzat S, Rosen IB, Freeman JL, Asa SL, 1998: Distinct multiple RET/PTC gene rearrangements in multifocal papillary thyroid neoplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 83:4116-22.

## VII. LITERATURVERZEICHNIS

- Suzuki H, Willingham MC, Cheng SY, 2002: Mice with a mutation in the thyroid hormone receptor beta gene spontaneously develop thyroid carcinoma: a mouse model of thyroid carcinogenesis. *Thyroid* 12:963-9.
- Sweet-Cordero A, Tseng GC, You H, Douglass M, Huey B, Albertson D, Jacks T, 2006: Comparison of gene expression and DNA copy number changes in a murine model of lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 45:338-48.
- Takabatake T, Fujikawa K, Tanaka S, Hirouchi T, Nakamura M, Nakamura S, Braga-Tanaka I, Ichinohe K, Saitou M, Kakinuma S, Nishimura M, Shimada Y, Oghiso Y, Tanaka K., 2006: Array-CGH analyses of murine malignant lymphomas: genomic clues to understanding the effects of chronic exposure to low-dose-rate gamma rays on lymphomagenesis. *Radiat Res.* 166(1 Pt 1):61-72.
- Takenaka Y, Inohara H, Yoshii T, Oshima K, Nakahara S, Akahani S, Honjo Y, Yamamoto Y, Raz A, Kubo T, 2003: Malignant transformation of thyroid follicular cells by galectin-3. *Cancer Lett* 195:111-9.
- Tallini G und Costa J, 1997: Unraveling the pathogenesis of thyroid tumors using transgenic mice. *Lab Invest* 76:301-5.
- Tanaka H, Tapscott SJ, Trask BJ, Yao MC, 2002: Short inverted repeats initiate gene amplification through the formation of a large DNA palindrome in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8772-7.
- Theiler K, 1972: *The house mouse*. Springer Verlag Berlin. 43-129
- Thomas GA, Williams D, Williams ED, 1989: The clonal origin of thyroid nodules and adenomas. *Am J Pathol* 134:141-7.
- Thomas GA, Williams D, Williams ED, 1991: Reversibility of the malignant phenotype in monoclonal tumours in the mouse. *Br J Cancer* 63:213-6.
- Thomas GA und Williams ED, 1991: Evidence for and possible mechanisms of non-genotoxic carcinogenesis in the rodent thyroid. *Mutat Res* 248:357-70.
- Thomas GA und Williams ED, 1992: Production of thyroid tumours in mice by demethylating agents. *Carcinogenesis* 13:1039-42.
- Thomas GA, Bunnell H, Cook HA, Williams ED, Nerovnya A, Cherstvoy ED, Tronko ND, Bogdanova TI, Chiappetta G, Viglietto G, Pentimalli F, Salvatore G, Fusco A, Santoro M, Vecchio G, 1999: High prevalence of RET/PTC rearrangements in Ukrainian and Belarussian post-Chernobyl thyroid papillary carcinomas: a strong correlation between RET/PTC3 and the solid-follicular variant. *J Clin Endocrinol Metab* 84:4232-8.
- Thomas GA und Williams ED, 1999: Thyroid stimulating hormone (TSH)-associated follicular hypertrophy and hyperplasia as a mechanism of thyroid carcinogenesis in mice and rats. *IARC Sci Publ*:45-59.
- Todd GC, 1986: Induction and reversibility of thyroid proliferative changes in rats given an antithyroid compound. *Vet Pathol* 23:110-7.
- Tomlinson IP, Lambros MB, Roylance RR, 2002: Loss of heterozygosity analysis: practically and conceptually flawed? *Genes Chromosomes Cancer* 34:349-53.
- Tronko MD, Bogdanova TI, Komissarenko IV, Epstein OV, Oliynyk V, Kovalenko A, Likhtarev IA, Kairo I, Peters SB, LiVolsi VA, 1999: Thyroid carcinoma in children and adolescents in Ukraine after the Chernobyl nuclear accident: statistical data and clinicomorphologic characteristics. *Cancer* 86:149-56.

## VII. LITERATURVERZEICHNIS

- Trovato M, Ulivieri A, Dominici R, Ruggeri RM, Vitarelli E, Benvenga S, Barresi G, Trimarchi F, Brunetti E, Vecchione A, Andreoli M, Sciacchitano S, 2004: Clinico-pathological significance of cell-type-specific loss of heterozygosity on chromosome 7q21: analysis of 318 microdissected thyroid lesions. *Endocr Relat Cancer* 11:365-76.
- Tsutsui T, Suzuki N, Ohmori M, 1984: Sodium fluoride-induced morphological and neoplastic transformation, chromosome aberrations, sister chromatid exchanges, and unscheduled DNA synthesis in cultured syrian hamster embryo cells. *Cancer Res* 44:938-41.
- Tzen CY, Huang YW, Fu YS, 2003: Is atypical follicular adenoma of the thyroid a preinvasive malignancy? *Hum Pathol* 34:666-9.
- van Dekken H, Paris PL, Albertson DG, Alers JC, Andaya A, Kowbel D, van der Kwast TH, Pinkel D, Schroder FH, Vissers KJ, Wildhagen MF, Collins C, 2004: Evaluation of genetic patterns in different tumor areas of intermediate-grade prostatic adenocarcinomas by high-resolution genomic array analysis. *Genes Chromosomes Cancer* 39:249-56.
- Vaquerizas JM, Dopazo J, Diaz-Uriarte R, 2004: DNMAID: web-based diagnosis and normalization for microarray data. *Bioinformatics* 20:3656-8.
- Viglietto G, Chiappetta G, Martinez-Tello FJ, Fukunaga FH, Tallini G, Rigopoulou D, Visconti R, Mastro A, Santoro M, Fusco A, 1995: RET/PTC oncogene activation is an early event in thyroid carcinogenesis. *Oncogene* 11:1207-10.
- Vogelstein B und Kinzler KW, 2004: Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10:789-99.
- Walinder G und Sjöden AM, 1971: Effect of irradiation on thyroid growth in mouse foetuses and goitrogen challenged adult mice. *Acta Radiol Ther Phys Biol* 10:579-92.
- Walinder G, 1972: Late effects of irradiation on the thyroid gland in mice. I. Irradiation of adult mice. *Acta Radiol Ther Phys Biol* 11:433-51.
- Walinder G und Sjöden AM, 1972: Late effects of irradiation on the thyroid gland in mice. II. Irradiation of mouse foetuses. *Acta Radiol Ther Phys Biol* 11:577-89.
- Walinder G und Sjöden AM, 1973: Late effects of irradiation on the thyroid gland in mice. 3. Comparison between irradiation of foetuses and adults. *Acta Radiol Ther Phys Biol* 12:201-8.
- Ward JM, Goodman DG, Squire RA, Chu KC, Linhart MS, 1979: Neoplastic and nonneoplastic lesions in aging (C57BL/6N x C3H/HeN)F1 (B6C3F1) mice. *J Natl Cancer Inst* 63:849-54.
- Ward LS, Brenta G, Medvedovic M, Fagin JA, 1998: Studies of allelic loss in thyroid tumors reveal major differences in chromosomal instability between papillary and follicular carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 83:525-30.
- Warren S und Meissner WA, 1953: Tumors of the thyroid gland. *In: Atlas of tumor pathology. Armed Forces Institute of Pathology, Washington D. C.*
- Weber KB, Shroyer KR, Heinz DE, Nawaz S, Said MS, Haugen BR, 2004: The use of a combination of galectin-3 and thyroid peroxidase for the diagnosis and prognosis of thyroid cancer. *Am J Clin Pathol* 122:524-31.
- WHO - World Health Organization: siehe Hedinger, 1988; DeLellis, 2004
- Williams BO, Remington L, Albert DM, Mukai S, Bronson RT, Jacks T, 1994: Cooperative tumorigenic effects of germline mutations in Rb and p53. *Nat Genet* 7:480-4.
- Williams D, 2002: Cancer after nuclear fallout: lessons from the Chernobyl accident. *Nat Rev Cancer* 2:543-9.

## VII. LITERATURVERZEICHNIS

- Williams ED, 2000: Guest Editorial: Two Proposals Regarding the Terminology of Thyroid Tumors. *Int J Surg Pathol* 8:181-183.
- Williams ED, Abrosimov A, Bogdanova T, Demidchik EP, Ito M, LiVolsi V, Lushnikov E, Rosai J, Sidorov Y, Tronko MD, Tsyb AF, Vowler SL, Thomas GA, 2004: Thyroid carcinoma after Chernobyl latent period, morphology and aggressiveness. *Br J Cancer* 90:2219-24.
- Woo RA und Poon RY, 2004a: Activated oncogenes promote and cooperate with chromosomal instability for neoplastic transformation. *Genes Dev* 18:1317-30.
- Woo RA und Poon RY, 2004b: Gene mutations and aneuploidy: the instability that causes cancer. *Cell Cycle* 3:1101-3.
- Xing M, 2005: BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 12:245-62.
- Xing M, Westra WH, Tufano RP, Cohen Y, Rosenbaum E, Rhoden KJ, Carson KA, Vasko V, Larin A, Tallini G, Tolaney S, Holt EH, Hui P, Umbrecht CB, Basaria S, Ewertz M, Tufaro AP, Califano JA, Ringel MD, Zeiger MA, Sidransky D, Ladenson PW, 2005: BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 90:6373-9.
- Yeh JJ, Marsh DJ, Zedenius J, Dwight T, Delbridge L, Robinson BG, Eng C, 1999: Fine-structure deletion mapping of 10q22-24 identifies regions of loss of heterozygosity and suggests that sporadic follicular thyroid adenomas and follicular thyroid carcinomas develop along distinct neoplastic pathways. *Genes Chromosomes Cancer* 26:322-8.
- Ying H, Suzuki H, Furumoto H, Walker R, Meltzer P, Willingham MC, Cheng SY, 2003: Alterations in genomic profiles during tumor progression in a mouse model of follicular thyroid carcinoma. *Carcinogenesis* 24:1467-79.
- Zarrin K und Hanichen T, 1974: Comparative histopathological study of the canine thyroid gland in London and Munich. *J Small Anim Pract* 15:329-42.
- Zeiger MA und Dackiw AP, 2005: Follicular thyroid lesions, elements that affect both diagnosis and prognosis. *J Surg Oncol* 89:108-13.
- Zhu Z, Gandhi M, Nikiforova MN, Fischer AH, Nikiforov YE, 2003: Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of ras mutations. *Am J Clin Pathol* 120:71-7.

## **VIII. ANHANG**

### **1. Materialien**

#### **1.1. Herstellungsrezepte für die verwendeten Lösungen**

<u>TBS-Puffer für IHC:</u>	300 ml	NaCl-Lösung (250 g NaCl in 3 l destilliertem Wasser)
	300 ml	Tris-Puffer (181,7 g Tris in 3 l destilliertem Wasser)
	2,4 l	destilliertes Wasser
	pH 7,6	
<u>Zitratpuffer für IHC:</u>	10 mM	Zitratpuffer pH6
	0,1 %	Tween 20
<u>SDS-Lysepuffer für DNA-Extraktion aus FFPE:</u>		
	50 mM	Tris pH 8
	100 mM	EDTA pH 8
	100 mM	Natriumchlorid
	1 %	SDS
<u>PCR-Puffer:</u>	0,2 mM	je dNTP
	1,5 mM	Magnesiumchlorid
	60 mg/ml	Succhrose
	40 µg/ml	Kresolrot
<u>Hybridisierungslösung für CGH:</u>	100 µl	Maus-Cot1 DNA [1 µg/µl]
	25 µl	tRNA aus Hefen [20 µg/µl]
	1 µl	Glykogen [20 mg/ml]
	25 µl	5M Ammoniumazetat
	500 µl	100%iges Ethanol
<u>Spüllösung für CGH:</u>	0,1 %	SDS
	ad 1000 ml	MilliQ-Wasser®
<u>Prähybridisierungslösung für CGH:</u>	25 %	deionisiertes Formamid
	5x	SSC
	0,1 %	SDS
	0,01 %	BSA
	ad 100 ml	MilliQ-Wasser ®
<u>Feuchtkammer-Lösung bei CGH:</u>	50 %	deionisiertes Formamid
	2x	SSC
	ad 100 ml	MilliQ-Wasser®
	pH 7	
<u>Waschlösung 1 bei CGH:</u>	2x	SSC
	0,2 %	SDS
	ad 1000 ml	MilliQ-Wasser®
<u>Waschlösung 2 bei CGH:</u>	2x	SSC
	ad 1000 ml	MilliQ-Wasser®
<u>Waschlösung 3 bei CGH:</u>	0,2x	0,2x SSC
	ad 1000 ml	MilliQ-Wasser®

## VIII. ANHANG

<u>Blocklösung für FISH:</u>	3 %	BSA
	4x	SSC
	0,1 %	NP40
<u>TBE-Puffer:</u>	10,78 g	Tris pH8
	5,5 g	Borsäure
	0,58 g	EDTA
	ad 1000 l	destilliertes Wasser

### **1.2. Sonstige Verbrauchsmaterialien und Chemikalien**

Ammoniumazetat (NH <sub>4</sub> Ac 5 M)	Sigma Aldrich
Avidin-HRPO (300 µg/ml)	Ventana Medical Systems
Biotherm™ DNA-Polymerase 5000u, 5u/µl	GeneCraft, Deutschland
BSA (Bovines Serum Albumin), pH7, 50g	Sigma Aldrich
DAB	Diaminbenzidin
Dextran-Sulfat (Natrium-Salz), 5g	Sigma Aldrich
Dyes (6x Loading Dye Solution)	Fermentas
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Roth, Karlsruhe
Eindeckmedium Eukitt®	Firma Kindler, Freiburg
Ethanol	VWR, Darmstadt
Ethidiumbromid	VWR, Darmstadt
Fluorlink Cy3-dUTP, 25 nM	Amersham Biosciences
Fluorlink Cy5-dUTP, 25 nM	Amersham Biosciences
Formamid dejonisiert (1 l)	Merck, VWR International Eurolab
Glykogen [20 mg/ml]	Roche Diagnostics, Mannheim
i-View-Inhibitor (3%ige Hydrogenperoxid-Lösung)	Ventana Medical Systems
MilliQ®-Wasser	Millipore
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumthiocyanat (NaSCN)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
NP40 (Nonidet® P40)	Boehringer Mannheim
Objektträger SuperFrost Plus	Roth, Karlsruhe
PBS, pH 7,4	Sigma Aldrich
Proteinase K 20 µg/µl	Merck, Darmstadt
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Serva
SSC (Sodium Chloride-Sodium Citrate), 20fach konzentriert	Sigma Aldrich
Tris (Hydroxymethyl-Aminomethanhydrochlorid) pH8	Merck, Darmstadt
tRNA aus Hefen (Yeast tRNA) [20 µg/µl]	GIBCO, Invitrogen
Tween 20	Serva



2. Tabellenanhang

**Tab. VIII.1.** Verwendete **Mikrosatelliten-Marker**: Sequenzen der Vorwärts- und Rückwärtsprimer nach MGI Internet-Datenbank ([http://www.informatics.jax.org/menus/marker\\_menu.shtml](http://www.informatics.jax.org/menus/marker_menu.shtml))

Mikrosatellit	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer
D2Mit493	GTCTCTACCTGAGTTTCCATCACA	TCCCGAGTTGTCCCTCTATG
D2Mit37	TGTGCAAGCCAGAAAAGTTG	GAAGGGGATTGTAAATTGGTACC
D2Mit27	AGGCTAAGCCTTGCATCAAA	GTCGCAAAATGTGGATGATG
D4Mit166	GGTCATGGGTGAAAAGAATTG	GAGTAGGTAGGTAGGGAAGCAGG
D5Mit345	ATCTTGATCCTCCTGCTTTAACC	CAAAGTTGCCACAGATATTTGC
D5Mit193	TGTCTTTAAAGTGGCCCAGG	TGTTTTCTATGTGTTTTATATGCTTCA
D5Mit346	CTGTGCCTCTGTCTGTGCAA	GCACTTCCATATTAGAGGAGTTTG
D5Mit1	AATAAAGCTGTGAGGTAAACCCC	GAAACAAATGATTGTTTTGAGCC
D5Mit61	TGTGAGGGTGTGTTGAGAGACA	AAAGCTCTGAGTTTGATACACAAA
D5Mit348	CTGACCAGAACACAGCATAGTACA	TTTAAAATAGGAAAAGCATTCCTTTCC
D5Mit349	TCCAGTTCTCATAGATGTCTAAGCC	CTTCTGTGTATCTACACCACTGGG
D5Mit347	CTCTCATTTCTGTTTCCTTTTCTCC	CTTACAAAAATCATGCACATGTAGG
D5Mit13	CATCGTTGCTCTTGACAGGA	CCGGGAGAACCCAAATAAGT
D5Mit352	CCCAGAGCCCACATCAAG	TAGGTGGGTGTGTCTCTCCC
D6Mit1	GGCACATTTGCCTTTGTTTT	TCTCCTATCTCTCCACCTTTTCC
D6Mit74	CATGTGCAGTGTAAGTAAGACCTC	TCTCCTCCATCCTTCTCCAT
D6Mit207	TAATGTTGGAGGTATTACTTTGTGTG	AACTACATCCAAAAAACTCACAAGA
D6Mit243	CTGCTTGTCCCTTTGACCTCC	CTGGTTTCCTGATTTTTATATTAAATG
D7Mit228	ATTCTTGGCCTTTTCTTGTAACA	AAACCTCCACACTGACTTCCA
D7Mit80	AGCAACACAGATTGGACTTGG	CATCCTTCTGACTCTTTCCCC
D11Mit177	GTAATGGTTATCACAGGAAGTTTGG	ACCCAGTCTGCAACATAACC
D14Mit34	GCAGAAGGGTGATTTTCCTTG	TACACGCATGATGCAGACAA
D11Mit35	AGTAACATGGAACATCGACGG	TGCTCAGCTCTGGAGTGCTA
D11Mit38	CCACTATATCCTTAAAGACACGGG	TCTGAACCACAAATGTAAACAAGG
D14Mit215	TTTTAATTTGTGTGTGACTGAGTGG	ACATGCCTGTGAGGTGAGC
D14Mit225	GATATATCAAGGCTTCCTAAACACA	TCAGCATGCAGTTTAAAGTAGATG
D14Mit69	TCCTCTCCCATCATAAATGG	GTCTCTAACCTCCATCCAGC
D14Mit125	GTTGAGGTCCCACTGCAAAT	TTGAAGGAGATATATCACTCTGTGTG
D14Mit34	GCAGAAGGGTGATTTTCCTTG	TACACGCATGATGCAGACAA
D15Mit171	CCCATCAGTCCAAGAGAGATG	AGGTGTACAGAAGTTCAGAAACAGC
D19Mit41	AGCCCTCCACCCAGTTTC	TCTGGGGAAAAAGGATGAGA
D19Mit40	CAGGGTAGTATTGCAGATAATCAA	AAAGTTTCTTTGTGTGTGCACG
D19Mit46	ACCCTGCCCTCTCTCTCC	GCACTCGCCAACTCAGGTAT
D19Mit19	CCTGTGTCCATACAGGCTCA	ACCATATCAGGAAGCACCATG
D19Mit17	GCCCACTTTATATAGAAACATGC	TAAAACATGAGGCAAGCTTAAGC

## VIII. ANHANG

**Tab. VIII.2.** Verwendete **Mikrosatelliten-Marker** und deren Lokalisation auf den Chromosomen in Basenpaar (bp) und Zentimorgan (cM) laut MGI-Datenbank ([http://www.informatics.jax.org/menus/marker\\_menu.shtml](http://www.informatics.jax.org/menus/marker_menu.shtml)). Die Zahl nach dem D gibt jeweils das Chromosom an (z. B. D2Mit27 ist auf Chromosom 2). Die letzte Spalte enthält die F1-Hybride bei welchen der jeweilige Marker angewandt wurde (eingeklammerte Mauslinien sind bezüglich des angewandten Markers wenig informativ).

Chromosom	Mikrosatellit	Lokalisation (bp)	Position (cM)	F1-Mausgruppen
2	D2 Mit 27	k. A.	87	BH
	D2 Mit 37	74.494.612 - 74.494.783	45	(H6), J6, BH
	D2 Mit 493	153.664.347 - 153.664.456	72,1	H6, J6
4	D4 Mit 166	93.366.857 - 93.367.013	44,5	H6
5	D5 Mit 1	17.129.970 - 17.130.106	5	J6
	D5 Mit 13	37.712.393 - 37.712.583	20	H6
	D5 Mit 61	21.374.269 - 21.374.367	8	(H6, J6)
	D5 Mit 193	4.238.832 - 4.238.967	1	H6
	D5 Mit 345	4.229.461 - 4.229.558	1	H6, BH
	D5 Mit 346	4.885.434 - 4.885.561	1	(H6)
	D5 Mit 347	k. A.	8	(H6)
	D5 Mit 348	24.429.184 - 24.429.306	8	(H6)
	D5 Mit 349	24.479.227 - 24.479.366	8	H6, BH
	D5 Mit 352	35.931.828 - 35.931.937	20	H6
	D6 Mit 1	15.094.274 - 15.094.496	2,8	H6, (J6)
	D6 Mit 74	48.656.142 - 48.656.291	20,5	H6, J6
	D6 Mit 207	44.395.478 - 44.395.623	19	H6
7	D7 Mit 228	72.244.404 - 72.244.519	30,4	H6
	D7 Mit 228	39.798.667 - 39.798.813	18	(H6)
	D7 Mit 80	40.012.301 - 40.012.445	18	(H6)
11	D11 Mit 35	k. A.	47,59	BH
	D11 Mit 38	k. A.	49	H6, (J6)
	D11 Mit 177	65.029.080 - 65.029.210	36	(H6), BH
14	D14 Mit 34	70.383.286 - 70.383.441	40	BH
	D14 Mit 69	75.358.279 - 75.358.421	43	J6, BH
	D14 Mit 125	86.458.079 - 86.458.237	44,3	H6, (J6)
	D14 Mit 215	57.321.174 - 57.321.296	22,5	H6, J6
	D14 Mit 225	73.664.369 - 73.664.489	42,5	H6, (J6)
15	D15 Mit 171	89.885.124 - 89.885.256	54,5	(H6), J6
19	D19 Mit 17	45.604.911 - 45.605.050	43	J6
	D19 Mit 19	39.493.130 - 39.493.267	26	H6, (J6)
	D19 Mit 40	25.403.418 - 25.403.529	25	(H6), J6
	D19 Mit 41	18.743.419 - 18.743.582	16	H6, J6
	D19 Mit 46	33.001.204 - 33.001.316	24	(BH)

k. A. = keine Angaben

# VIII. ANHANG

**Tab. VIII.3.** Mikrodissezierte **Proben für die LOH-Untersuchung** (Mauslinie, Geschlecht, Alter, Radiojod-Gabe und histologischer Befund des mikrodissezierten Gewebes)

Proben-Nr.	Mauslinie	Geschlecht*	Alter (Tage)	Radiojod-Gabe	Histologischer Befund
03/930	H6F1	m	132	ja	opB
609	H6F1	m	524	ja	opB
615	H6F1	m	524	ja	opB
658	H6F1	f	524	ja	opB
660	H6F1	m	524	ja	opB
661	H6F1	m	524	ja	opB
*910	H6F1	f	477	ja	opB
*433	H6F1	m		ja	simple Hyperplasie
*656	H6F1	f	525	ja	simple Hyperplasie
862	H6F1	f	476	ja	simple Hyperplasie <sup>1</sup>
870	H6F1	f	476	ja	simple Hyperplasie
871	H6F1	f	476	ja	simple Hyperplasie
872	H6F1	f	476	ja	simple Hyperplasie <sup>1</sup>
895	H6F1	m	476	ja	simple Hyperplasie
896	H6F1	m	476	ja	simple Hyperplasie <sup>1</sup>
897	H6F1	m	475	ja	simple Hyperplasie <sup>1</sup>
936	H6F1	m	478	ja	simple Hyperplasie
937	H6F1	m	478	ja	simple Hyperplasie
655	H6F1	f	525	ja	noduläre Hyperplasie
868	H6F1	f	476	ja	noduläre Hyperplasie
873	H6F1	f	476	ja	noduläre Hyperplasie
875	H6F1	f	476	ja	noduläre Hyperplasie
876	H6F1	f	476	ja	noduläre Hyperplasie
920	H6F1	f	477	ja	noduläre Hyperplasie
922	H6F1	m	477	ja	noduläre Hyperplasie
923	H6F1	m	477	ja	noduläre Hyperplasie
*928	H6F1	f	478	ja	noduläre Hyperplasie
*929	H6F1	f	478	ja	noduläre Hyperplasie
930	H6F1	f	478	ja	noduläre Hyperplasie
03/1920	H6F1	m	251	ja	noduläre Hyperplasie
653	H6F1	m	525	ja	atypisches FA
869	H6F1	f	476	ja	FA
874	H6F1	f	476	ja	FA
934	H6F1	m	478	ja	FA
951	H6F1	f	468	nein	FA
931	J6F1	f	483	ja	atypisches FA in NH
932	J6F1	f	483	ja	multiple FA
933	J6F1	m	483	ja	FA in NH
846	BHF1	m	481	ja	FA
847	BHF1	m	481	ja	opB
848	BHF1	m	480	ja	simple Hyperplasie
850	BHF1	f	473	ja	simple Hyperplasie
855	BHF1	f	473	ja	simple Hyperplasie
828	BHF1	f	478	ja	FA
829	BHF1	m	479	ja	FK

## Legende:

\*Fünf der 45 Proben konnten mangels Gewebematerial nicht in die LOH-Studie mit eingeschlossen werden

<sup>1</sup>Der Befund bezieht sich auf das mikrodissezierte Material, und wich in drei Fällen vom histologischen Gesamtbefund (noduläre Hyperplasie) ab

## VIII. ANHANG

**Tab. VIII.4. Mikrodissezierte Proben für die CGH-Analyse** (Mauslinie, Geschlecht, Alter, Radiojod-Gabe und histologischer Befund des mikrodissezierten Gewebes) sowie eingesetztes Referenzgewebe.

Proben-Nr.	Mauslinie	Geschlecht <sup>1</sup>	Alter (d)	I131-Gabe	Histologischer Befund <sup>2</sup>	Referenzgewebe <sup>3</sup>
598	J6F2	m	538	ja	opB	FFPE
593	J6F2	m	537	ja	opB	FFPE
*584	J6F2	w	536	ja	simple Hyperplasie	FFPE
592	J6F2	m	537	ja	simple Hyperplasie	FFPE
86	J6F2	m	337	ja	noduläre Hyperplasie	FFPE
171	J6F2	m	350	nein	noduläre Hyperplasie	FFPE
582	J6F2	w	536	ja	noduläre Hyperplasie	FFPE
778	J6F2	w	475	ja	noduläre Hyperplasie	TT
782	J6F2	w	475	ja	noduläre Hyperplasie	FFPE
792	J6F2	m	479	ja	noduläre Hyperplasie	FFPE
795	J6F2	w	479	ja	noduläre Hyperplasie	FFPE
796	J6F2	w	479	ja	noduläre Hyperplasie	TT
1548	J6F2	m	230	ja	noduläre Hyperplasie	FFPE
1887	J6F2	m	242	ja	noduläre Hyperplasie mit solidem Knoten	FFPE
1888	J6F2	m	317	ja	noduläre Hyperplasie mit solidem Knoten	FFPE
662 H	J6F2	w	534	ja	noduläre Hyperplasie	FFPE
662 A	J6F2	w	534	ja	FA (mikrofollikulär)	FFPE
798 s	J6F2	w	480	ja	FA (solide)	FFPE
590	J6F2	w	537	ja	multizentrisches FK und SH	FFPE
665 s	JHF2	m	534	ja	FK (solide)	FFPE
665 p	JHF2	m	534	ja	FK (papillär-solide)	FFPE
669	JHF2	w	534	ja	multizentrisches FK (solide)	FFPE
793 s	J6F2	m	480	ja	FK (solide)	FFPE
793 m	J6F2	m	480	ja	FK (solide-makrofollikulär)	FFPE & TT
798 m	J6F2	w	480	ja	FK (solide-mikrofollikulär)	FFPE - Mix
*802	JHF2	m	472	ja	FK (gemischt)	FFPE
961	J6F2	w	476	nein	multizentrisches FK	FFPE & TT

Legende:

<sup>1</sup>Geschlecht: f = weiblich, m = männlich

<sup>2</sup>Der Befund entspricht dem bei Mikrodissektion gewonnenen Material und muss nicht der Diagnose der gesamten Schilddrüse entsprechen: opB = ohne pathologischen Befund, FA = Adenom, FK = Karzinom

<sup>3</sup>Referenzgewebe:

FFPE = Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes, mikrodisseziertes Gewebe,

TT = Schwanzspitzengewebe,

FFPE-Mix = Mischung aus FFPE-Referenzgewebe aller übrigen weiblichen Mäuse

\*Nr. 802 und 584 wurden wegen zu geringer DNA-Menge im Isolat nicht in die Auswertung miteinbezogen

# VIII. ANHANG

**Tab. VIII.5.** Alle pathologischen **Befunde der H6F1-Hybridmäuse**, sortiert nach Fall-Nummern: (in Klammern steht jeweils die Anzahl gleichartiger Läsionen)

Fall-Nr.	I131-Gabe	Geschlecht	Alter (d)	Befund 1	nähere Beschreibung	Befund 2
03/1920	ja	m	251	NH	pseudopapillär	
03/1928	ja	m	253	SH	parenchymatöse Struma	
163	ja	m	349	SH	kolloide Struma	
433	ja	m		SH	pseudopapilläre Hyperplasie	
653	ja	m	525	FA (1)	atypisch, mikrofollikulär	
655	ja	w	525	NH (multipel)	gemischt	
656	ja	w	525	SH	parenchymatöse Struma	
861	ja	w	476	SH	parenchymatöse Struma	
862	ja	w	476	NH (1)	pseudopapillär	
863	ja	w	476	SH	pseudopapilläre Hyperplasie	
867	ja	w	476	NH (multipel)	pseudopapillär	
868	ja	w	476	NH (2)	gemischt	
869	ja	w	476	FA (1)	makrofollikulär	NH (multipel)
870	ja	w	476	SH	Struma mit Pseudopapillen	
871	ja	w	476	SH	Struma mit Pseudopapillen	
872	ja	w	476	NH (multipel)	gemischt	
873	ja	w	476	NH (multipel)	gemischt	
874	ja	w	476	FA (1)	follikulär	SH
875	ja	w	476	NH (multipel)	gemischt	
876	ja	w	476	NH (multipel)	gemischt	
895	ja	m	476	SH	Struma mit Pseudopapillen	
896	ja	m	476	NH (2)	gemischt	
897	ja	m	475	NH (1)	gemischt	
898	ja	m	476	opB		Zyste
899	ja	m	475	opB		Zyste
907	ja	m	477	opB		Zyste
912	ja	w	476	SH	parenchymatöse Struma	
915	ja	m	477	SH	pseudopapilläre Hyperplasie	
916	ja	m	477	opB		Zyste
917	ja	w	476	NH (1)	zystisch-pseudopapillär	
918	ja	w	476	FA (1)	follikulär	
919	ja	w	476	NH (1)	pseudopapillär	
920	ja	w	477	NH (multipel)	gemischt	
921	ja	m	476	opB		Zyste
922	ja	m	477	NH (multipel)	gemischt	
923	ja	m	477	NH (2)	gemischt	
928	ja	w	478	NH (1)	mikrofollikulär	
929	ja	w	478	NH (2)	gemischt	
930	ja	w	478	NH (2)	pseudopapillär	
934	ja	m	478	FA (1)	mikrofollikulär	SH
935	ja	m	478	SH	parenchymatöse Struma	
936	ja	m	478	SH	Struma mit Pseudopapillen	
937	ja	m	478	SH	Struma mit Pseudopapillen	
951	nein	w	468	FA (1)	mikrofollikulär-solide	
953	nein	w	468	opB		Zyste
954	nein	w	468	opB		Zyste
958	nein	m	468	opB		Zyste

## Legende:

Geschlecht: w = weiblich, m = männlich

SH = simple Hyperplasie, NH = noduläre Hyperplasie, FA = follikuläres Adenom, FK = follikuläres Karzinom

## VIII. ANHANG

**Tab. VIII.6.** Alle pathologischen **Befunde der BHF1-Hybridmäuse**, sortiert nach Fall-Nummern:

Fall-Nr. 04 /	I131- Gabe	Geschlecht	Alter (d)	Befund 1	nähere Beschreibung	Befund 2
756	nein	m	505	opB		Zyste
828	ja	m	473	<b>FA</b> (1)	makrofollikulär	NH (multipel)
829	ja	m	480	<b>FK</b> (1)	solide	
846	ja	m	480	<b>FA</b> (1)	mikrofollikulär	
848	ja	w	473	SH	parenchymatöse Struma	
849	ja	w	473	SH	parenchymatöse Struma	
850	ja	w	478	SH	parenchymatöse Struma	
855	ja	m	479	SH	Struma mit Pseudopapillen	
857	ja	m	478	SH	parenchymatöse Struma	
858	ja	m	478	SH	Struma mit Pseudopapillen	
859	ja	w	478	SH	Struma mit Pseudopapillen	
860	ja	w	481	SH	parenchymatöse Struma	
864	ja	m	481	SH	parenchymatöse Struma	
865	ja	m	481	SH	parenchymatöse Struma	

**Tab. VIII.7.** Alle pathologischen **Befunde der J6F1-Hybridmäuse**, sortiert nach Fall-Nummern:

Fall-Nr. 04 /	I131- Gabe	Geschlecht	Alter (d)	Befund 1	nähere Beschreibung	Befund 2
931	ja	w	483	<b>FA</b> (1)	atypisch, solide- mikrofollikulär	NH (1)
932	ja	w	483	<b>FA</b> (2)	atypisches solides FA und follikuläres FA	
933	ja	m	483	<b>FA</b> (1)	follikulär	NH (1)

**Tab. VIII.8.** Alle pathologischen **Befunde der JHF1-Hybridmäuse**, sortiert nach Fall-Nummern:

Fall-Nr. 04 /	I131- Gabe	Geschlecht	Alter (d)	Befund 1	nähere Beschreibung	Befund 2
608	ja	m	535	SH	Struma mit Pseudopapillen	
610	ja	w	529	<b>FA</b> (1)	mikrofollikulär	NH (1)
611	ja	w	529	<b>FA</b> (1)	solide-mikrofollikulär	SH
612	ja	w	529	<b>FK</b> (1)	solide	<b>FA</b> (1), NH (2)
630	ja	w	531	SH	parenchymatöse Struma	

Legende für die Tabellen VIII.6.-8.:

Geschlecht: w = weiblich, m = männlich

SH = simple Hyperplasie

NH = noduläre Hyperplasie

**FA** = follikuläres Adenom

**FK** = follikuläres Karzinom

## VIII. ANHANG

**Tab. VIII.9.** Alle pathologischen **Befunde der J6F2-Hybridmäuse**, sortiert nach Fall-Nummern:

Fall-Nr. 04 /	I131- Gabe	Geschlecht	Alter (d)	Befund 1	nähere Beschreibung	Befund 2
03/1548	ja	m	230	NH (multipel)	solide-makrofollikulär	
03/1887	ja	m	242	NH (multipel)	solide-follikulär	solider Knoten
03/1888	ja	m	317	NH (multipel)	gemischt	solider Knoten
86	ja	m	337	NH (multipel)	mikrofollikulär	
171	nein	m	350	NH (3)	solide-mikrofollikulär	
244	ja	w	391	SH	Struma mit Pseudopapillen	
386	ja	w	420	NH (multipel)	mikrofollikulär	
395	ja	w	499	SH	parenchymatöse Struma	
582	ja	w	536	NH (2)	follikulär	
584	ja	w	536	SH	Struma mit Pseudopapillen	
585	ja	m	536	SH	parenchymatöse Struma	
587	ja	m	536	opB		Zyste
588	ja	w	537	opB		Zyste
589	ja	w	536	<b>FK</b>	mikrofollikulär-solide	SH
590	ja	w	537	<b>FK</b> (multipel)	microfollikulär-solide	SH
592	ja	m	537	SH	Struma mit Pseudopapillen	
596	ja	m	538	SH		
597	ja	m	538	NH (1)	follikulär	
599	ja	w	538	SH	parenchymatöse Struma	
662	ja	w	534	<b>FA</b> (1)	mikrofollikulär-solide	NH
663	ja	w	534	opB		Zyste
666	ja	m	534	opB		Zyste
778	ja	w	475	NH (multipel)	mikrofollikulär-solide	
780	ja	w	475	<b>FA</b> (2)	mikrofollikulär-solide	
781	ja	w	475	SH	pseudopapilläre Hyperplasie	
782	ja	w	475	NH (3)	mikrofollikulär	
783	ja	m	475	NH (1)	mikrofollikulär	Zyste
784	ja	m	475	NH (multipel)	gemischt	
785	ja	m	474	NH (2)	mikrofollikulär	
792	ja	m	479	NH (multipel)	solide-follikulär	
793	ja	m	480	<b>FK</b> (2)	solide bzw. macrofollikulär-solide	NH
794	ja	w	479	opB		Zyste
795	ja	w	479	NH (multipel)	follikulär	
796	ja	w	479	NH (multipel)	solide-mikrofollikulär	
798	ja	w	480	<b>FK</b> (1)	solide-mikrofollikulär	<b>FA</b> (solide)
960	nein	w	476	NH (1)	mikrofollikulär	
961	nein	w	476	<b>FK</b> (multipel)	solide-mikrofollikulär	
962	nein	m	476	NH (1)	mikrofollikulär	
963	nein	m	476	NH (2)	gemischt	

Legende:

Geschlecht: w = weiblich, m = männlich

SH = simple Hyperplasie

NH = noduläre Hyperplasie

**FA** = follikuläres Adenom

**FK** = follikuläres Karzinom

# VIII. ANHANG

**Tab. VIII.10.** Alle pathologischen Befunde der JHF2-Hybridmäuse, sortiert nach Fall-Nummern:

Fall-Nr. 04 /	I131- Gabe	Geschlecht	Alter (d)	Befund 1	nähere Beschreibung	Befund 2
03/1927	ja	m	256	NH (3)	mikrofollikulär	
03/2098	ja	m	352	SH	kolloide Struma	
162	ja	m	354	SH	parenchymatöse Struma	
253	ja	w	467	SH	kolloide Struma	
320	ja	m	482	NH (multipel)	mikrofollikulär	
434	ja	w	420	FA (1)	solide-mikrofollikulär	NH (multipel)
605	ja	m	538	SH	kolloide Struma	
664	ja	w	534	NH (2)	mikrofollikulär	
665	ja	m	534	FK (bilateral)	solide und papillär	SH
667	ja	m	534	SH	parenchymatöse Struma	
668	ja	w	534	NH (2)	mikrofollikulär	
669	ja	w	534	FK (multipel)	solide	SH
786	ja	w	475	SH	parenchymatöse Struma	
799	ja	m	480	SH	parenchymatöse Struma	
800	ja	m	480	SH	pseudopapilläre Hyperplasie	
801	ja	m	472	NH (multipel)	mikrofollikulär	
802	ja	m	472	FK (2)	papillär und solide	
803	ja	m	471	NH (1)	mikrofollikulär	
804	ja	m	472	NH (1)	solide-mikrofollikulär	
805	ja	w	471	FK (1)	solide	NH (2)
809	ja	m	472	SH	Struma mit Pseudopapillen	
810	ja	w	472	SH	parenchymatöse Struma	
811	ja	w	471	FK (1)	solide	NH
812	ja	w	471	SH	parenchymatöse Struma	
825	ja	m	472	SH	parenchymatöse Struma	
826	ja	m	472	SH	parenchymatöse Struma	
827	ja	m	472	NH (3)	gemischt	
1027	nein	m	467	SH	parenchymatöse Struma	
1029	nein	w	467	SH	kolloide Struma	
1032	nein	w	468	SH	kolloide Struma	
1033	nein	w	468	SH	kolloide Struma	

## Legende:

Geschlecht: w = weiblich, m = männlich

SH = simple Hyperplasie

NH = noduläre Hyperplasie

FA = follikuläres Adenom

FK = follikuläres Karzinom



# VIII. ANHANG

**Tab. VIII.11.** Ergebnisse der LOH-Studie bei den einzelnen H6F1-Mäusen (n = 30) für die 14 Mikrosatelliten-Marker mit in mindestens einem Fall detektierter LOH:

Fall:	Marker:		D4 Mit166	D5 Mit193	D5 Mit345	D5 Mit349	D5 Mit13	D5 Mit352	D6 Mit1	D6 Mit243	D11 Mit38	D14 Mit125	D14 Mit225	D14 Mit215	D19 Mit19	D19 Mit41
03/930	opB	m	O	O	O	O	-	-	O	-	O	O	O	O	O	O
609	opB	m	O	O	O	O	-	-	O	-	O	O	O	O	O	O
615	opB	m	O	O	O	O	-	-	O	-	O	O	O	O	O	O
658	opB	w	O	O	O	O	-	-	O	-	O	O	O	O	O	O
660	opB	m	O	O	O	O	-	-	O	-	O	O	O	O	O	O
661	opB	m	O	O	O	O	-	-	O	-	O	O	O	O	O	O
862	SH	w	O	O	O	O	-	-	O	-	O	-	O	O	O	O
870	SH	w	O	O	O	O	-	-	O	-	O	-	O	O	O	O
871	SH	w	O	O	O	O	-	-	O	-	O	O	O	O	O	O
872	SH	w	O	O	O	O	-	-	O	-	O	O	O	O	O	O
895	SH	m	O	O	O	O	-	-	O	-	O	<i>ho</i>	O	O	O	O
896	SH	m	O	O	O	O	-	-	O	-	O	O	O	O	O	O
897	SH	m	O	O	O	O	-	-	O	-	O	O	O	O	O	O
936	SH	m	O	O	O	O	-	-	O	-	O	O	O	O	O	O
937	SH	m	O	O	O	O	-	-	O	-	O	O	O	O	O	O
655	NH	w	O	O	O	O	-	-	O	-	O	O	O	O	O	O
868	NH	w	O	O	O	O	-	-	O	-	O	O	O	O	O	O
873	NH	w	O	O	O	O	-	-	O	-	O	O	O	O	O	O
875	NH	w	O	O	O	O	-	-	O	-	O	O	O	O	O	O
876	NH	w	O	O	O	O	-	-	O	-	O	O	O	O	O	O
920	NH	w	O	O	O	O	-	-	O	-	O	<b>LOH</b>	O	O	O	O
922	NH	m	O	O	O	O	-	-	O	-	O	<b>LOH</b>	O	O	O	O
923	NH	m	O	O	O	O	-	-	O	-	O	<b>LOH</b>	O	O	O	O
930	NH	w	O	O	O	O	-	-	O	-	O	<i>ho</i>	O	O	O	O
03/1920	NH	m	O	O	O	O	-	-	O	-	O	<b>LOH</b>	O	O	O	O
653	FA	m	O	O	O	<b>LOH</b>	<b>LOH</b>	<b>LOH</b>	<b>LOH</b>	<b>LOH</b>	<b>LOH</b>	<b>LOH</b>	<b>LOH</b>	<b>LOH</b>	O	O
869	FA	w	O	O	O	O	-	-	O	-	O	O	O	O	<b>LOH</b>	<b>LOH</b>
874	FA	w	-	O	O	O	-	-	O	-	O	O	O	O	O	O
934	FA	m	<b>LOH</b>	<b>LOH</b>	<b>LOH</b>	<b>LOH</b>	<b>LOH</b>	<b>LOH</b>	O	-	O	O	O	O	O	O
951 (I)	FA	w	O	O	O	O	-	-	O	-	O	<i>ho</i>	O	O	O	O

Legende: O = keine LOH (heterozygot); LOH = Loss of Heterozygosity; *ho* = homozygote Maus; „-“ = zu wenig DNA

## **DANKSAGUNG**

Zunächst einmal möchte ich mich vielenmal bei **Prof. Schmahl** für das Ermöglichen und die Leitung der Doktorarbeit bedanken. **Prof. Höfler** danke ich sehr für die Überlassung des Arbeitsplatzes und des Themas der Dissertation.

**Mike Atkinson** danke ich herzlich für die ausgezeichnete Betreuung der Arbeit. Deine positive Einstellung und die stets hilfreichen fachlichen Gespräche ließen nie den geringsten Zweifel an einem erfolgreichen Gelingen zu.

**Leticia Quintanilla-Fend** gilt ein besonders großes Dankeschön für die Unterstützung in den letzten Jahren. Ohne Deine Hilfe bei der histologischen Auswertung, Deine Ideen und Dein ständiges Engagement wären diese Arbeit und vieles andere nicht möglich gewesen.

Bei **Michael Rosemann** bedanke ich mich für die Überlassung des Untersuchungsmaterials und die Hilfsbereitschaft bei geduldiger Beantwortung aller meiner Fragen.

**Almudena Real:** Muchas, muchas gracias por todo: Por hospedarnos, por charlar y reír a menudo y tambien por la cantidad de PCRs.

**Alberto Jimenez:** Thank you very much for your help, for teaching me all about the CGH-Analysis, and for the great time I had in Madrid.

**Karin Bink** und **Ulrike Buchholz** danke ich vielenmal für die Arbeit und die Hilfe bei Ausführung und Auswertung der FISH-Analyse.

Vielen lieben Dank an das ganze **Histo-Team**, **Elenore Samson**, **Nadine Kink**, **Claudia Kloss**, **Jacqueline Müller** und **Frau Holthaus**, für den Berg an Arbeit, den Ihr übernommen habt und für Euere fortwährende Hilfsbereitschaft.

**Eva Alešík:** Ich danke Dir dafür, dass Du, nicht nur in den letzten zwei Jahren, immer an meiner Seite stehst, an mich glaubst und mir bei allem den nötigen Rückhalt gibst. Danke und entschuldige, dass Du die Strapazen mit so einer Doktorarbeit ein zweites Mal mitmachen, „meine Launen ertragen, Dir die Nächte um die Ohren schlagen...“ musstest.

Meiner **Mama**, meinem **Papa**, **Elli**, **Julia**, **Philipp**, meinen **Großeltern** und **Familie Dunkl** möchte ich dafür danken, dass Ihr mein ganzes Leben lang für mich da wart und seid. Insbesondere meinen Eltern danke ich für Euer Vertrauen in mich und dafür, dass Ihr mich bei allem unterstützt und mir so vieles ermöglicht habt.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei **Margit Klier** und **Christiane Werckenthin**, dass Ihr Teile bzw. die gesamte Arbeit Korrektur gelesen und wertvolle Hinweise gegeben habt, und bei **Jan Smida** für Deine hilfreiche Unterstützung bei der Auswertung und Interpretation der CGH-Daten.

**Julia Calzada-Wack** und **Ilona Mossbrugger** danke ich dafür, dass Ihr mir in den letzten Wochen soviel Arbeit abgenommen habt. Euch und auch allen anderen Leuten aus der **Patho** danke für das geduldige Ertragen meines Jammerns und für die aufmunternden Worte, sowie viele, viele Kleinigkeiten, die mir dennoch sehr geholfen haben.